

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

**Fabiana Dias Trivelato Martins**

**EFEITO DO AQUECIMENTO AMBIENTAL NA MORFOFISIOLOGIA  
TEGUMENTAR DO LAMBARI DO JEQUITINHONHA - *ASTYANAX*  
*BREVIRHINUS* (CHARACIDAE)**

**Diamantina**

**2018**

**Fabiana Dias Trivelato Martins**

**EFEITO DO AQUECIMENTO AMBIENTAL NA MORFOFISIOLOGIA  
TEGUMENTAR DO LAMBARI DO JEQUITINHONHA - *ASTYANAX*  
*BREVIRHINUS* (CHARACIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Alex Sander Dias Machado

**Diamantina**

**2018**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M386e

Martins, Fabiana Dias Trivelato

Efeito do aquecimento ambiental na morfofisiologia tegumentar do  
Lambari do Jequitinhonha - *Astyanax brevirostris* (Characidae) /  
Fabiana Dias Trivelato Martins. – Diamantina, 2018.  
90 p. : il.

Orientador: Alex Sander Dias Machado

Dissertação (Mestrado Profissional – Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Animal) - Universidade Federal dos Vales do  
Jequitinhonha e Mucuri.

1. Aquecimento. 2. Estresse oxidativo . 3. Histologia. 4. Tecido  
tegumentar. 5. Escama. 6. VEGF. I. Machado, Alex Sander Dias. II.  
Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 597**

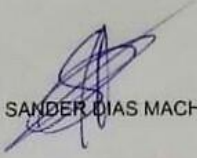
FABIANA DIAS TRIVELATO MARTINS

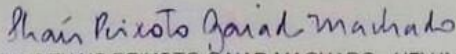
**Efeito do aquecimento ambiental na morfofisiologia tegumentar do  
Lambari do Jequitinhonha - *Astyanax brevirostris* (Characidae)**

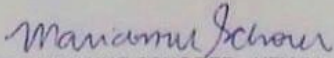
Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL,  
nível de MESTRADO como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MAGISTER SCIENTIAE EM  
BIOLOGIA ANIMAL

Orientador (a): Prof. Dr. Alex Sander  
Dias Machado

Data da aprovação : 14/09/2018

  
Prof.Dr. ALEX SANDER DIAS MACHADO - UFVJM

  
Prof.Dr.ª THAIS PEIXOTO GAIAD MACHADO - UFVJM

  
Dr.ª MARIANNE SCHORER - UFVJM

DIAMANTINA

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por sempre me guiar durante esses anos, por ser meu suporte em todos os momentos, me fazendo trilhar caminhos para o meu crescimento e por mais uma conquista alcançada.

A minha família, por minha ausência durante esses oito anos, por todo apoio e compreensão. Minha mãe por estar sempre ao meu lado, por acreditar em mim desde o princípio e nunca duvidar da minha capacidade, mesmo quando eu duvidei. Por todas as suas orações e apoio incondicional, a caminhada foi mais leve com seus conselhos e ensinamentos. Ao Tio Zé, meu exemplo de pai, por me acolher como sua filha e acreditar em meus sonhos, sua ajuda foi fundamental para que tudo isso se realizasse. Ao Gabriel, meu irmão companheiro, sou muito grata pela oportunidade de convivência diária nesses últimos meses, o nosso elo é único.

Ao Prof. Alex Sander Dias Machado, pela oportunidade e conhecimento compartilhado, pela paciência, atenção e todo apoio oferecido, principalmente pelo incentivo, positividade e confiança em trabalhar com a PELE!

Ao NEA, pelo acolhimento e as pessoas que conheci, na qual compartilhei experiências e descobertas. Em especial a Ana, minha parceira, pela amizade, por todas as conversas, desesperos e alegrias, crescemos juntas nesta jornada. A Carol e Riccelly pelo companheirismo, pelos campos e rotinas de laboratório. A Andrea, Paula, Heloisa e André pela amizade e ajuda nessa reta final.

Ao ICMBio, em especial ao Márcio pela dedicação e ajuda nas idas em campo para as nossas coletas no PNSV. Ao laboratório de aquicultura DZO, por abrirem as portas para a realização do nosso experimento, em especial a Mari por toda ajuda. Ao laboratório BIOEX, a Karine e Bruna por toda disponibilidade.

A Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e ao Programa de Pós- Graduação de Biologia Animal pelo ensino.

A Biologia por ter me despertado tanta curiosidade e entusiasmo, além de me presentear com amizades que levarei para a vida. Em especial, a Ray, minha irmã, companheira e cúmplice, sou muito grata por tudo que vivemos e ainda vamos viver. A Regi, por todo apoio e companheirismo. A Dy, por me acolher e me confortar durante esses anos. Ao Will, por toda paciência e compreensão.

A todos que acreditaram no meu potencial, muito obrigada!

“Nunca desista de um sonho só por causa do tempo que você vai levar para realizá-lo. O tempo vai passar de qualquer forma.”

Renato Maia

## Resumo

A temperatura é um dos fatores abióticos que tem maior influência na vida dos organismos aquáticos, define os limites de sobrevivência, as adaptações comportamentais, fisiológicas e moleculares. Este trabalho teve o objetivo de relacionar o efeito do aumento da temperatura às respostas comportamentais e fisiológicas, além da descrição histológica do tegumento do *Astyanax brevirostris*. Os animais foram submetidos a um experimento de aumento da temperatura, a partir da temperatura da coleta ambiental (20°C) sendo aumentada gradualmente (24°C, 28°C, 32°C), até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS), representada por colapsos fisiológicos. Cada temperatura quando atingida era mantida por um período de 2h e feitas gravações de vídeo na última hora do experimento para análise comportamental. Foram analisados os parâmetros físico-químicos da água, o comportamento dos animais, posteriormente foram eutanasiados e extraído o tecido tegumentar da região latero-caudal dos animais para análises histológicas, histopatológicas, imuno-histoquímica e espécies reativas de oxigênio (EROs). A descrição histológica do tecido demonstrou que o tegumento possui escamas, é constituído por um tecido epitelial apresentando células epiteliais, células de muco (caliciformes), células de alarme (claviformes) e células de pigmentação (melanóforos), seguido por uma derme formada por uma camada de tecido conjuntivo frouxo e denso, de onde se origina a escama. Na histopatologia do aquecimento encontramos, infiltrados inflamatórios, recrutamento de neutrófilos e áreas de necrose. A análise da expressão da proteína VEGF no tecido demonstrou relação qualitativa em todas as temperaturas, com maior expressão nos animais submetidos a TCS. Nos resultados do estudo de EROs foi evidenciado que a pele apresentou dano oxidativo, alterações na concentração da enzima antioxidante SOD, antioxidante não enzimático FRAP e biomarcadores TBARS. Os parâmetros físico-químicos da água como oxigênio dissolvido (OD) e pH também apresentaram alterações com o aumento da temperatura, influenciando nas respostas fisiológicas dos peixes. Os resultados desse estudo mostram que o aumento gradual da temperatura ativa recrutamento de mecanismos fisiológicos para a homeostase celular e tecidual na espécie estudada, além do limite térmico tolerado geram colapsos fisiológicos podendo levar a morte do indivíduo.

Palavras chave: aquecimento, estresse oxidativo, histologia, tecido tegumentar, escama, VEGF.

## ABSTRACT

Temperature is one of the most important factors in the life of aquatic individuals; it defines the limits of survival, such as behavioral, physiological and molecular adaptations. This work aimed to relate the effect of temperature increase on behavioral and physiological patterns, as well as the histological description of the tegument of *Astyanax brevirostris*. The animals were subjected to a gradual increase in temperature, from the mean temperature of 24 ° C, 28 ° C, 32 ° C, to a critical survival (TCS), represented by physiological collapses. All the time it was held for a 2 hour period and the video recordings in the last hour of the experiment for behavioral analysis. The physical-chemical effects of water, animal behavior, were forced and extracted from tegument tissue of the late-caudal region of the animals for histological, histopathological, immunohistochemical and reactive oxygen species (ROS) analyzes. A histological description of the tissue demonstrated that the surgical mechanism presents scales, consisting of epithelial cells epithelial cells, mucous cells (goblets), alarm cells (claviformes) and cells of pigmentation (melanophores), followed by a dermis formed by a layer of loose, dense connective tissue from which a scale originates. In the histopathology of the heat we find, inflammatory infiltrates, recruitment of neutrophils and areas of necrosis. An analysis of the VEGF protein in the tissue demonstrated a qualitative relation at all temperatures, with higher expression in the animals submitted to TCS. The results of the study of ROS were evidenced as an antioxidant antioxidant, antioxidant and antioxidant SOD, antioxidant and enzymatic FRAP and TBARS biomarkers. The physical-chemical ions of water such as dissolved oxygen (OD) and pH are also altered with increasing temperature, influencing the physiological responses of fish. The results of this study were gradually increased for the activation of physiological mechanisms for cellular and tissue homeostasis in studied species; besides the tolerable thermal limit generate physiological collapses capable of leading to death of the individual.

Key words: heating, oxidative stress, histology, integument, scale, VEGF.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - Mapa da região da coleta (em vermelho se destaca o Parque Nacional Sempre-Vivas).

**Figura 2** - Coleta ambiental.

**Figura 3** - Procedimentos experimentais.

**Figura 4** – *A. brevirohinus* vivo (superior) e dissecado para coleta de tegumento (inferior).

**Figura 5** - Médias das pontuações atribuídas a cada um dos parâmetros comportamentais de cada grupo submetidos a diferentes temperaturas.

**Figura 6** - Média das pontuações comportamentais (equilíbrio, natação e batimento opercular) entre os grupos avaliados a cada temperatura.

**Figura 7** -Histologia a do tegumento de *A. brevirohinus*. Coloração HE, aumento 20x.

**Figura 8** - Histopatologia do tegumento *A. brevirohinus* sob aumento gradual de temperatura. Coloração HE, aumento 10x/20x.

**Figura 9** – Fotomicrografias do tegumento *A. brevirohinus* submetidos a técnica de imuno-histoquímica anti-VEGF – 1:10000 e contracoradas com Hematoxilina.

**Figura 10-** : Fotomicrografias da expressão anti-VEGF – 1:10000 de *A. brevirohinus* submetidos a técnica de imuno-histoquímica e contracoradas com Hematoxilina (vasos).

**Figura 11** - Efeito do aumento gradual da temperatura nas concentrações de TBARS no tecido tegumentar (Concentração: MDA/mg prot.).

**Figura 12-** Efeito do aumento gradual da temperatura na capacidade antioxidante não enzimático -FRAP (Concentração:  $\mu\text{m FeSO}_4/\text{mg}$  de proteína).

**Figura 13** - Efeito do aumento gradual da temperatura na capacidade antioxidante total - SOD (Concentração: U/mg prot.).

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Classificação da espécie *Astyanax brevirohinus*, LIMA *et al* 2003 .

**Tabela 2** - Identificação dos grupos para o experimento.

**Tabela 3-** Etograma de classificação comportamental.

**Tabela 4-** Tabela de estudos comportamentais adaptado de Cocking (1959).

**Tabela 5** - Identificação dos grupos para o procedimento de estresse oxidativo.

**Tabela 6- -** Níveis de OD e pH dos tanques experimentais.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CAT - Catalase

DAB - Chromogen substrate bulk pack

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

IHQ - Imuno - histoquímica

HE - Coloração Hematoxilina/Eosina

OD - Oxigênio dissolvido

PBS - Tampão fosfato salina

pH – Potencial Hidrogênico

TBARS - Thiobarbituric Reactive Substances

TCS - Temperatura crítica de sobrevivência

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

## Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
Alterações climáticas	17
Estresse térmico	18
Tolerância térmica x Peixes	19
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular	20
Parâmetros Redox	20
<i>Astyanax brevirostris</i>	22
Bacia do Jequitinhonha	24
Tecido tegumentar dos teleósteos	24
Tipos celulares tegumentares	25
Células epiteliais	25
Células de muco (Caliciformes)	25
Células de alarme (Claviformes)	26
Escama	26
3 OBJETIVOS	27
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
Área de estudo	28
Captura e manutenção dos peixes	29
Procedimentos experimentais	30
Experimento do aquecimento gradual da temperatura	31
Parâmetros físico-químicos da água	32
Análises comportamental	32
Análises histológica	34
Preparação dos blocos para microscopia	34

Coloração e microscopia de luz	35
Imuno-histoquímica	35
Análises de parâmetros redox	37
Preparo da amostra – Maceração	38
Análise da peroxidação lipídica	38
Derivados carbonílicos em proteínas	38
Atividade da enzima CAT	39
Atividade da enzima SOD	39
Capacidade antioxidante não enzimática	40
Dosagem de proteínas	40
<b>5 RESULTADOS</b>	41
Parâmetros físico-químicos da água	41
Análise comportamental	42
Análises histológica	43
Estrutura geral da pele	43
Epiderme	43
Célula Epitelial	44
Célula de Muco	44
Célula de Alarme	44
Célula de pigmentação (melanóforos)	44
Derme	45
Escama	45
Histopatologia	46
Imuno-histoquímica	47
Parâmetros redox	50
<b>6 DISCUSSÃO</b>	53
Parâmetros físico-químicos da água	53

Análise comportamental	54
Histologia	56
Histopatologia	59
Imuno-histoquímica	60
Parâmetros redox	61
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO I	84
ANEXO II	85
ANEXO III	86
ANEXO IV	87

## 1 INTRODUÇÃO

A temperatura é um dos fatores abióticos que tem maior influência na vida dos organismos, podendo causar modificações comportamentais, fisiológicas e moleculares (ANGILLET JR, 2009). Segundo FREDERICH & PÖRTNER (2000) as consequências do aumento da temperatura nos ecossistemas aquáticos incluem mudanças nos períodos e no sucesso reprodutivo, alterações no recrutamento, nas taxas de crescimento e na distribuição geográfica de espécies. Comprometendo também a velocidade das reações, o estado conformacional das macromoléculas e a estabilidade das proteínas, além do efeito mais devastador a letalidade desses organismos (FRY, 1947).

O estudo da fisiologia térmica de organismos ectotérmicos foram utilizados por diversos autores como PUNZO & ROSEN (1984), através de combinações entre o método estático e o método dinâmico para a determinação da tolerância térmica dos peixes. Esses estudos são induzidos pelo aumento de temperatura e assim, observado as respostas tanto comportamentais como fisiológicas dos organismos nesta condição (PÖRTNER, 2001). O aumento da temperatura causa um maior consumo do oxigênio, resultando numa menor disponibilidade ou mesmo hipóxia tecidual, diminuindo a capacidade aeróbica mitocondrial (BENNETT, 1978; PÖRTNER, 2002).

As interações entre limitação de oxigênio, temperatura ambiental e níveis de comportamento dos animais encontrados em hipóxia devem ser levadas em conta nos estudos de mudanças térmicas, uma vez que essa limitação produz uma síntese de proteínas mediadoras para a sobrevivência celular, além do excesso de radicais livre provocando o estresse oxidativo no organismo (PÖRTNER, 2002).

Quando falta oxigênio nos tecidos, os organismos procuram equilibrar suas reações biológicas em busca da homeostase para sua sobrevivência. As espécies reativas de oxigênio quando produzidas intensamente podem gerar dano celular e até a morte da célula, provocando o desequilíbrio redox (SIES & JONES, 2006). Um mecanismo de defesa para as EROs são os componentes conhecidos como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e moléculas que funcionam como biomarcadores, ambos encontrados em situação de estresse (POWERS & JACKSON, 2008).

Na sequência de eventos fisiológicos ao estresse térmico como mecanismos de proteção, a proteína fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), é recrutada como

alternativa para solucionar o desequilíbrio fisiológico, formando novos capilares que aumentam a capacidade de transporte do oxigênio para áreas em hipóxia.

A histopatologia e histologia são métodos de observação de respostas geradas em níveis teciduais pelo estresse do organismo, e quando associados a outros métodos de análise moleculares auxiliam na compreensão de modificações celulares no tecido (LINS *et al.*, 2010). Muitas são as limitações impostas pela temperatura para a sobrevivência dos peixes, estudos avaliando estas limitações em diferentes níveis de organização (celular, tecidual, fisiológica e comportamental) colaboram para o entendimento sobre possíveis perturbações climáticas.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### Alterações climáticas

As alterações climáticas são atualmente, consideradas umas das mais sérias ameaças ambientais a nível global, com fortes impactos nos ecossistemas naturais. A causa destas alterações é atribuída às emissões de Gases com efeito de estufa (GEE) resultantes das atividades antrópicas, causando um acréscimo ao efeito de estufa natural e um aquecimento médio adicional da superfície da Terra e da atmosfera, afetando assim os ecossistemas naturais e a humanidade (IPCC I, 2001).

Estudos realizados pelo IPCC (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas) sobre o efeito dessas alterações mostram que em um período de 100 anos houve aumento médio da temperatura global dos continentes de 0,85°C, da temperatura global do oceano de 0,55°C e da temperatura global da Terra de 0,7°C. Os estudos relatam também que a temperatura da água tenderá a aumentar de 1°C a 8°C nos próximos 200 anos (IPCC, 2007).

As variações de temperaturas é um dos mais importantes fatores abióticos no decorrer dos últimos anos responsável por grandes preocupações que podem interferir drasticamente no ciclo biológico dos organismos, influenciando diretamente na fisiologia e em níveis ecológicos emergentes, como populações, comunidade e ecossistema (PÖRTNER, 2008). Vários são os estudos que vem demonstrando que os sistemas biológicos já estão respondendo a essas mudanças climáticas, a partir da constatação de variações na distribuição geográfica de organismos terrestres e aquáticos (HEGERL *et al.* 2007).

O conhecimento do impacto da temperatura sobre uma espécie é fundamental para a compreensão de mudanças provocadas pelas alterações climáticas. O aumento do nível de CO<sub>2</sub> no ambiente está sinergicamente relacionado ao aumento de temperatura da água, reduzindo a disponibilidade de oxigênio que gera uma hipóxia ambiental (METZGER *et al.*, 2007). Um dos principais fatores que afetam a constituição das comunidades dos peixes, é a disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, já que estes organismos dependem de um fornecimento adequado deste gás para a oxigenação de seus tecidos (BALDISSEROTO *et al.*, 2008).

Esse fator resulta o estresse térmico, a hipoxemia sistêmica nos organismos, e a interação entre temperatura e hipoxemia molda respostas adaptativas a níveis moleculares. A integração destas respostas auxilia no ajuste e manutenção do metabolismo, e na funcionalidade

em todos os níveis, seja a nível celular, tecidual ou em todo o organismo (PÖRTNER & LANNING, 2009).

Mais de 20.000 espécies de peixes, animais ectodérmicos, possuem a temperatura do corpo associada diretamente com a temperatura da água (BEITINGER *et al.*, 2000), assim, estes animais são vulneráveis às variações ambientais de temperatura, tornando está um fator abiótico vital que influencia diretamente na sobrevivência dos organismos (BASU *et al.*, 2002).

Os organismos ectotérmicos apresentam uma zona de tolerância térmica, que é uma faixa de temperatura ambiental, na qual podem sobreviver indefinidamente e apresentar as melhores condições de se reproduzir, desenvolver e manter-se vivo por um determinado período dentro dessa faixa (WILLMER *et al.*, 2005). Os efeitos da mudança climática sobre essa biodiversidade podem ser estudados a partir de seções experimentais distribuídas nos diferentes ecossistemas, permitindo a obtenção de dados sobre os impactos dessa alteração abiótica em sua biologia (BUSTAMANTE *et al.*, 2012).

### **Estresse térmico**

A temperatura provoca mudanças na concentração de oxigênio ambiental, nos ambientes aquáticos, a concentração do oxigênio é determinada por fatores além da temperatura da água, a pressão atmosférica, a quantidade de substâncias dissolvidas, taxas de respiração de animais e plantas, difusão de luz, a decomposição de matéria orgânica e oxidação de íons metálicos (JUNK, 1997).

Nos ambientes aquáticos tropicais, essas fontes de perdas de oxigênio associadas a altas temperaturas (24-32°C) causam uma drástica queda nos níveis de oxigênio dissolvido (O<sub>2</sub>), uma condição ambiental conhecida como hipóxia (ESTEVES, 1998). A capacidade do organismo em obter oxigênio nestas condições é caracterizada como limite térmico máximo dos ectotérmicos aquáticos, no qual ocorre perda do desempenho funcional do organismo causado primariamente pelo estresse bioquímico. O metabolismo é reduzido, a demanda de O<sub>2</sub> é mantida em níveis basais através da redução da atividade aeróbica e utilização de respiração anaeróbica (PÖRTNER & LANNING, 2009).

As alterações comportamentais provocadas constituem mecanismos adaptativos que visam, em geral, reduzir ou eliminar a exposição à agentes desse estresse. Quando possível, o comportamento mais imediato é a fuga ou imobilização (GALHARDO & OLIVEIRA, 2006). Em peixes a resposta ao estresse é considerada um mecanismo adaptativo, que permite ao animal lidar com os estressores, a fim de manter seu estado normal ou homeostático, para seu crescimento e a sua sobrevivência (BARTON, 2002, YAMASHITA *et al.*, 2010).

### **Tolerância térmica x Peixes**

A resposta do peixe ao estresse provocado pelo aumento da temperatura pode ser dividida em três fases: o reconhecimento da ameaça à homeostase, a própria resposta ao estresse e por último as consequências desse estresse. Cada fase possui eventos biológicos distintos que são iniciados pela percepção do estressor através do sistema nervoso central (BARTON & IWAMA, 1991).

A primeira etapa envolve as respostas neuroendócrinas, que incluem a liberação de catecolaminas e de hormônios corticosteroides na corrente sanguínea. A segunda fase inclui mudanças na concentração do plasma, nos níveis de metabólitos, nas características hematológicas e nas proteínas, as quais se relacionam com os ajustes fisiológicos, como no metabolismo, na função imune e nas respostas celulares. A última fase se refere ao animal como um todo, com alterações no crescimento, na resistência à doença, no comportamento e na sobrevivência (BARTON, 2002).

O estresse a tolerância térmica pode ser determinado em laboratório por dois principais métodos: o dinâmico e o estático. O método dinâmico, utilizado neste estudo, consiste no aumento gradual da temperatura a partir de uma de aclimação, até que ocorra desorganização física em resposta ao estressor termal (REYES *et al.*, 2011). Pelo método dinâmico são determinadas as médias de temperaturas máximas e mínimas que um animal tolera, denominadas de temperatura crítica máxima (critical thermal maximum) - CTMax e temperatura crítica mínima (critical thermal minimum) - CTMin (BEITINGER *et al.*, 2000).

O conceito de temperatura crítica máxima utilizado é o proposto por BRETT (1979), é definida como a temperatura na qual a atividade motora se torna desorganizada, e os animais perdem sua capacidade de escapar de condições possivelmente letais. A variação térmica age como uma pressão ambiental capaz de provocar estresse, e este podem ser superados, através da capacidade adaptativa do organismo ao promover ajustes comportamentais e fisiológicos (BILYK & DEVRIES, 2011).

O estudo da fisiologia térmica dos organismos ectotérmicos é complexo, pois o método avalia as respostas do animal neste ambiente ao longo do tempo, os limites fisiológicos de tolerância térmica se diferem entre as espécies, devido a temperatura de aclimação e o tempo de exposição ao agente estressor (BEITINGER *et al.*, 2000).

### **VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular**

Quando os organismos são expostos a temperaturas elevadas e subletais, a síntese de um conjunto de proteínas específicas é induzida. Estas proteínas fazem parte de mecanismos de proteção das proteínas celulares durante o estresse térmico, e ajudam na recuperação celular após o estresse (CRAIG, 1985).

Quando falta oxigênio nos tecidos, é induzida a transcrição do VEGF, que medeia a sobrevivência celular pela ativação transcricional de genes que auxiliam na manutenção da homeostase celular (DAVIES *et al.*, 2011). A ativação do VEGF ocorre por vários estímulos, como a hipóxia ou isquemia, baixo pH, citocinas, fatores de crescimento, tamanho do tumor, entre outros (GRAÇA *et al.*, 2004).

O VEGF, por sua vez, estimula o recrutamento de células endoteliais para a formação de novos capilares que aumentam a capacidade de transporte do oxigênio para áreas em hipóxia, um processo denominado angiogênese (LEE *et al.*, 2004). Em situações de baixa tensão de oxigênio, há um aumento da quantidade de óxido nítrico circulante e, por conseguinte, ocorre uma vasodilatação periférica e bloqueio da degradação dos fatores indutores e de resposta a hipóxia (HIF e HIF1 $\alpha$ ) (BOUDREAU & MYERS, 2003).

O VEGF é responsável pelos estímulos necessários à proliferação das células do endotélio vascular, bem como pelas migrações destas para formação de novos tubos capilares que darão origem a vasos de maior calibre de acordo com a necessidade de estímulos (NICOSIA, 1998). O papel dessas proteínas é importante, fazem parte dos principais mecanismos que permitem com que os organismos ectodérmicos sobrevivam a uma faixa mais ampla de temperatura, aumentando a capacidade de preservar ou restaurar a integridade das células que se desnaturam quando ocorre a perturbação térmica (HOFMANN & TODGHAM, 2010).

A imuno-histoquímica é a técnica que permite a identificação e a localização desses componentes celulares e teciduais através da reação com anticorpos específicos. Permitindo estabelecer com precisão a distribuição, a localização e a intensidade da expressão das proteínas, tais como o fator de crescimento do endotélio vascular, VEGF, objeto do estudo (SARTORIO, 2013).

### **Parâmetros Redox**

A hipóxia interfere diretamente na respiração celular aeróbica, os ajustes feitos para aumentar a chegada de oxigênio podem não ser suficientes para atender a demanda do tecido através do metabolismo aeróbio. Os baixos índices de ATP disponíveis na célula ou sua

ausência, levará a uma redução do seu metabolismo e, também, alterações morfológicas da célula, por isso, muitos peixes recorrem ao metabolismo anaeróbico para produção de energia (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001).

Durante essa situação, a formação de radicais livres ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (fatores endógenos) e pela exposição a fatores exógenos (SILVA *et al.*, 2009). Os peixes sensíveis ao estresse oxidativo, causado, pelo estresse térmico, provocam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em níveis elevados e/ou uma diminuição do seu sistema antioxidante. As EROs são formadas como subprodutos normais do metabolismo celular, e as vezes podem ser também geradas por oxidases em respostas a fatores de crescimento e citocinas podendo servir como mensageiros secundários em vias de sinalização específicas (BARZILAI *et al.*, 2004; ABELE & PUNTARULO, 2004).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante, para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (MAXWELL, 1995; SIES, 1993). Entre as consequências da ação desse estresse pode ocorrer a oxidação de proteínas, DNA, como a peroxidação de lipídios insaturados nas membranas celulares (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2002).

A atividade e a expressão das enzimas antioxidantes, assim como outros marcadores não enzimáticos são temas de pesquisas realizadas para a avaliação dos organismos submetidos a estresse térmico (ENZOR & PLACE, 2014), às enzimas antioxidantes SOD e CAT e os biomarcadores TBARS e FRAP foram objetos deste estudo.

A Superóxido-Dismutase (SOD) tem papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, atua na remoção do  $O_2^{\bullet-}$  formando  $O_2$  e  $H_2O$ . Está presente em todos os organismos aeróbicos e compartimentos celulares onde é provável que ocorra o estresse oxidativo (BOWLER *et al.*, 1992), a SOD é responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (MODESTO & MARTINEZ, 2010).

Catalase (CAT) são enzimas responsáveis pela eliminação do  $H_2O_2$ , quando existe aumento excessivo em sua concentração. A CAT evita o acúmulo de metahemoglobina, resultante da oxidação da hemoglobina. O peróxido de hidrogênio, em seguida, é degradado em água e oxigênio molecular através da ação da CAT, essa enzima está associada com outras enzimas antioxidantes (como a SOD e glutathione redutase e peroxidase) sendo capaz de remover, neutralizar ou eliminar as EROs (TKACHENKO *et al.*, 2014).

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – Poder Antioxidante de redução do Ferro é uma alternativa de biomarcador desenvolvido para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos (PULIDO *et al.* 2000). Neste método, o complexo férrico-tripiridiltiazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm<sup>38</sup> (BENZIE, 1996).

Outro método para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esse método consiste na análise dos produtos da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm, ou por fluorescência a 515nm de excitação e 555nm de emissão (YAGI 1976 apud; NETO *et.al* 2008).

### ***Astyanax brevirohinus***

Os Ostariophysi é um dos maiores grupos de Teleostei, inclui cerca de 25% das espécies de teleósteos e 75% da ictiofauna de água doce mundial (FINK & FINK, 1981). Estão presentes em todos os continentes, exceto na Antártica, Groenlândia e Nova Zelândia. Atualmente, a superordem abrange cinco ordens – Gonorynchiformes (milkfishes), Cypriniformes (carpas, barbos, dojôs), Characiformes (tetras, lambaris, pacus), Gymnotiformes (poraquês, sarapós, ituí) e siluriformes (bagres, cascudos, abotoados e mandis) distribuídas em 68 famílias, 1.075 gêneros e cerca de 7.900 espécies (NELSON, 2006).

Entre os Ostariophysi, a ordem Characiformes é o grupo dominante entre os peixes mais diversos e abundantes componentes de água doce do mundo, com aproximadamente 2.000 espécies distribuídas em 23 famílias (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Esse grupo não possui amplo conhecimento, seu elevado número de espécies, as semelhanças entre os gêneros e a falta de caracteres sinapomórficos para a definição de subfamílias como monofiléticas, fez com que diversos autores considerassem a maioria dos gêneros de Characidae como *incertae sedis* (com posição incerta) (LIMA *et al.*, 2003).

Vários gêneros da família Characidae constituem um grupo heterogêneo de peixes de pequeno a grande porte e têm sido incluídos na subfamília Tetragonopterinae (PACHECO, 2001). Devido à falta de evidências esta subfamília constituiu um grupo monofilético, foi listado 88 gêneros como “*Incertae Sedis*” que incluem 620 espécies. Dentre estas, 399 (64%) são taxonomicamente pouco definidas constituindo os grupos não monofiléticos de

Characidae: Hyphessobrycon (97 espécies), Astyanax (86 espécies), Moenkhausia (58 espécies), Bryconamericus (51 espécies) e Hemigrammus (43 espécies) (LIMA *et al.* 2003)

O gênero *Astyanax* foi inicialmente proposto por BAIRD & GIRARD em 1854 e a primeira revisão mais completa desta espécie foi realizada por Eigenmann entre 1921 e 1927 (LIMA *et al.* 2003) (Tabela 1). Posteriormente, GÈRY (1977) enumerou uma lista de 62 espécies e subespécies em águas doce do Brasil. A extrema diversidade morfológica pouco variável desse grupo foram motivos apontadas como dificuldades para a realização de estudos mais abrangentes das relações em Characiformes, é um grupo considerado relativamente comum, sendo o mais diversificado desta família, possuindo várias formas semelhantes, formando um complexo, do ponto de vista taxonômico (GARUTTI & BRITSKI, 2000; MOREIRA, 2007).

Tabela 1: Classificação da espécie *Astyanax brevirohinus*.

Classificação	Actinopterygii- Characiformes (Characins)- Characidae (Characins) - <i>Incertae sedis</i>
Ambiente/Clima	Subtropical / 23°C - 27°C/ pH: 6,2 - 7,5
Distribuição	América do Sul: bacia do rio Jequitinhonha.
Tamanho/Peso/Idade	Maturidade: não avaliado Comprimento máximo: 10,0 cm
Biologia	Não avaliado
Ciclo de vida e comportamento	Não avaliado
Status da lista vermelha da IUCN	Não avaliado
Ameaça aos humanos	Inofensivo

Fonte: (LIMA *et al.* 2003).

A maioria das espécies pertencentes a este grupo dulcícola, são onívoros, apresentam hábitos de forrageamento muito ativos, são popularmente conhecidos como lambaris, tambiuís, tetras ou piabas. Caracterizam-se por apresentar linha lateral completa, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, nadadeira caudal nua, com escamas apenas na base, habitam diversos ambientes, inclusive as águas de cabeceiras de rios e riachos (BRITSKI *et al.*, 1988).

### **Bacia do Jequitinhonha**

A América do Sul possui a mais rica fauna de peixes do mundo, e isso se deve ao fato de ela possuir os maiores sistemas fluviais. O Brasil, apresentando a maior parte desses sistemas, incorpora uma parcela significativa dessa biodiversidade. O nosso país concentra 20% de todas as espécies de peixes descritas no mundo, o que equivale, aproximadamente, a 3.000 espécies. O estado de Minas Gerais apresenta aproximadamente 12% das espécies que ocorrem no Brasil (SILVA, *et al.* 2012).

Contrastando com a alta diversidade se tem pouco conhecimento científico sobre os peixes de água doce, embora muitos já sejam popularmente conhecidos, ainda não estão descritos ou têm situação taxonômica indefinida. Apesar dos vários projetos de pesquisas desenvolvidos o conhecimento sobre a ictiofauna de água doce ainda é bastante heterogêneo. As ictiofaunas de algumas bacias têm sido intensamente estudadas e são relativamente bem conhecidas ou amostradas, enquanto outras são parcialmente conhecidas a partir de estudos esporádicos, e outras ainda nunca foram sequer estudadas, a bacia do Jequitinhonha foi classificada como insuficientemente conhecida (CONSERVATION INTERNATIONAL, 2000; VIEIRA *et al.* 2009).

A bacia hidrográfica do Rio Jequitinhonha está localizada nas regiões Nordeste e Sudeste, o rio nasce na região central do estado de Minas Gerais no município de Serro, na Serra do Espinhaço e deságua em Belmonte, no estado da Bahia, percorrendo uma extensão de 1.082 km. Possui grande índice de endemismo e espécies ameaçadas de extinção (IGAM, 2017).

Os peixes do rio Jequitinhonha são em sua maioria pouco pesquisados principalmente em razão do isolamento geográfico. A literatura sobre as espécies do rio Jequitinhonha é encontrada em contribuições isoladas, sendo os estudos mais antigos datados do século XIX onde despontam os trabalhos de Steindachner, Agassiz e Eigenmann, sendo de extrema importância estudos para novas contribuições morfológicas, ecológicas e taxonômicas sobre a ictiofauna desta bacia (GODINHO *et al.*, 1999).

### **Tecido tegumentar dos teleósteos**

O tecido epitelial é considerado um órgão acessório ao aparelho respiratório para a maioria dos peixes, com funções variadas devido ao seu contato com o meio externo, sendo composto por diversas células. A estrutura básica desse tecido é semelhante entre os diferentes grupos de peixes, mas características morfológicas e citológicas específicas podem ser



observadas. Além da função de proteção, esse tecido pode desempenhar outros papéis essenciais, como comunicação, percepção sensorial, locomoção, respiração, regulação iônica, excreção e regulação térmica (ELLIOTT, 2011a, 2011b; GARG *et al.*, 2010).

Esse tecido é organizado por dois estratos, o superficial (epiderme) e o basal (derme) constituídas por diferentes células. O estrato superficial, em contato com a superfície externa, é formado por células epiteliais achatadas, glândulas unicelulares (células de muco e alarme), células sensoriais. Este estrato é uma camada única indiferenciada de células epiteliais, considerada como um reservatório de células estaminais. Esta camada se encontra ligada à membrana basal por meio de junções celulares e conecta firmemente a epiderme à derme (ELLIOTT, 2011b; LE GUELLEC *et al.*, 2004).

A derme situada na camada basal é constituída por tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas com fibroblastos dispostas em diferentes sentidos, contém os anexos cutâneos, os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e as terminações nervosas sensoriais, que podem ser livres ou encapsuladas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Em algumas espécies particulares, podem ser encontrados órgãos acessórios na pele, como escamas, células glandulares, glândulas de veneno e órgão luminosos, na espécie em estudo se encontram escamas (HIBIYA, 1982).

## **Tipos celulares tegumentares**

### **Células epiteliais**

Assim como na epiderme de outros vertebrados, a unidade estrutural básica da epiderme dos peixes é a célula epitelial. Nos peixes teleósteos, as células epiteliais são ativas em todas as camadas epidérmicas (ELLIOTT, 2011b; HENRIKSON & MATOLTSY, 1968b). As células epiteliais superficiais produzem secreções mucosas, que forma uma cutícula na superfície da pele, composta por secreções oriundas de vários tipos celulares distintos (ELLIOTT, 2011b; GUERRA *et al.*, 2006).

### **Células de muco (Caliciformes)**

As células de muco são glândulas pluricelulares exócrinas, o número e tamanho das células de muco podem variar entre as espécies e dentro de uma mesma espécie em função do ambiente (WHITEAR *et al.*, 1986). Elas secretam muco, que, constituídos de mucina, uma glicoproteína lubrificante, que tem a função de proteção, redução da resistência do corpo contra água, regulação iônica e locomoção do peixe (HINTON E LAURÉN, 1990).

### **Células de alarme (Claviformes)**

As células claviformes ou de alarme são células secretoras de feromônio (substância de alarme) e essa substância é responsável pela reação de fuga dos peixes. Elas são encontradas em diferentes grupos de peixes, contudo, sua função não está totalmente estabelecida (ZACCONE *et al.*, 2001; RALPHS & BENJAMIN, 1992).

### **Escama**

O termo escama tem sido generalizado para todos os elementos de esqueleto duros, geralmente achatados, encontrados na pele de vertebrados aquáticos, o que inclui escamas placóides, ganóides, ciclóides e elasmóides. As escamas ciclóides são sub-circulares, em forma de disco e pouco espessas. Estes anéis são muito utilizados em estudos de determinação de idade em peixes. Supostamente não há troca desse órgão acessório, podem ocasionalmente ser perdidas e substituídas (PANFILI *et al.*, 2002; STORER, 2007; SANTOS & BARBIERI, 1993).

Essas estruturas são mantidas por citoesqueleto e sua função é mecânica, mantendo uma camada de muco produzido por outras células sobre a superfície do epitélio (UEHARA *et al.*, 1991). As escamas ósseas são formadas por duas finas camadas translúcidas: uma camada superficial óssea calcificada (principalmente composta por fosfato e carbonato de cálcio) e uma camada profunda fibrosa (basicamente de colágeno), está inserida na derme que se recobre de células epiteliais e a outra extremidade é livre. (UEHARA *et al.*, 1991; BEMVENUTI, 2010).

Considerando a complexidade e diversidade das estruturas que compõem a pele dos peixes, é notável sua importância em vários aspectos funcionais, alguns ainda pouco compreendidos. A epiderme e suas funcionalidades é muito desconhecida na família Characidae, apesar de existir diversos estudos sobre a morfologia da pele de vários teleósteos. É possível que as estruturas da epiderme do gênero *Astyanax* contribua com informações evolutivas e relações entre a morfologia e o ambiente, as quais permanecem pouco conhecidas (ARRATIA, 2003).

### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral**

Investigar como o aquecimento da água atua no comportamento e morfofisiologia do tegumento da espécie *Astyanax brevirostris*.

#### **Objetivos específicos**

- Descrever a histologia e morfologia das células que constituem o tegumento do *Astyanax brevirostris*;
- Avaliar as alterações comportamentais, fisiológicas e moleculares da espécie a partir da elevação experimental de temperaturas;
- Identificar a Temperatura Crítica de Sobrevivência (TCS) da espécie ao aquecimento;
- Identificar as células que podem ser afetadas pelo aquecimento através da análise da expressão de anti-VEGF por imuno-histoquímica;
- Avaliar parâmetros de oxidação (parâmetros redox) do tecido.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em quatro etapas:

- Análises comportamentais através de experimento do aumento gradual de temperatura (24°C, 28°C, 32°C) até a TCS;
- Análises histológicas e histopatológicas;
- Análises imuno-histoquímicas pela expressão do VEGF;
- Análises de parâmetros redox.

### Área de estudo

O Parque Nacional das Sempre-Vivas conta com área total de cerca de 124.000 hectares, abrangendo parte dos municípios de Diamantina, Buenópolis, Olhos D'Água e Bocaiúva, em Minas Gerais. Ele está inserido no bioma cerrado, com destaque para a fitofisionomia de campos rupestres, na porção meridional da Serra do Espinhaço, que divide as bacias dos Rios Jequitinhonha e São Francisco (MONTEIRO, 2011). É uma região de importância biológica com grande biodiversidade, alto grau de endemismo e existência de grandes áreas naturais conservadas. O território da unidade de conservação protege mais de 600 nascentes e todos os cursos d'água dos córregos do interior do parque descem para o entorno, não havendo o fluxo ao contrário (MMA 2003).

A temperatura média da região é 18,79 °C e precipitação média anual de 112,64 mm. A estação chuvosa é entre os meses de novembro até março, sendo os meses de maior precipitação dezembro e janeiro com médias de 237 mm e 231 mm. Nos meses de junho a setembro é a estação seca com o índice de precipitação de 125 mm e 113 mm nos meses de agosto e setembro. (ICMBIO, 2016).

Os peixes foram capturados na cabeceira do rio Inhaí, afluente do rio Jequitinhonha localizado no interior do Parque Nacional das Sempre Vivas (43° 46' 37,12" S e 17° 48' 22,17" W) (Figura 1), o ponto de coleta está localizado dentro da Fazenda Gavião (17°54' 32,22" S – 43°42' 33,26"), conhecido como córrego dos Felipes. As coletas foram realizadas entre os meses de setembro de 2016 a janeiro de 2018, sob a licença do SISBIO 26291-2.



Figura 1: Mapa da região da coleta (em vermelho se destaca o Parque Nacional Sempre-Vivas).

Fonte: Google fotos. Estrela – ponto de coletas – Nascente do Rio Inhaí.

### **Captura e manutenção dos peixes**

Para a captura dos peixes foi utilizada uma rede de arrasto de malha 10x10 mm com dimensões 3m x 1,5m (largura x altura) e uma peneira redonda de aço de 55 cm (Figura 2). Os peixes coletados para o experimento foram transportados em pequenos tanques contendo água do rio e encaminhados ao Laboratório de Aquicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (DZO-UFVJM) (Figura 3), onde permaneceram em repouso por cinco dias em tanques com água do rio na temperatura ambiente (20°C). Os peixes foram alimentados com ração comercial, em dias alternados e a higienização dos tanques foi feita diariamente. Os outros organismos capturados junto com os peixes no momento da coleta foram devolvidos ao rio durante a triagem.



Figura 2 - Coleta ambiental :a) Rio da coleta; b) Rede de arrasto de malha 10x10 mm com dimensões de 3m x 1,5m. c) peneira redonda para areia de aço de 55 cm; d) Peixes capturados. Fonte: Arquivo pessoal.

### **Procedimentos experimentais**

Os experimentos em laboratório foram aprovados junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFVJM n.58/2016B). Após o período de repouso, os animais foram separados em seis grupos com 13 indivíduos e distribuídos em tanques com 40L de água, onde permaneceram por 24 horas para minimizar o estresse decorrente da troca de ambiente (Figura3).

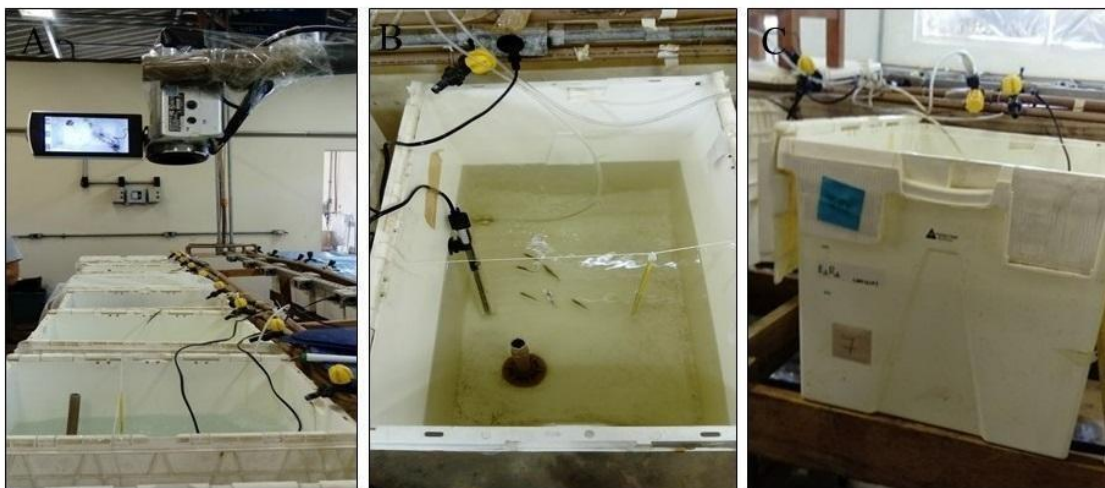


Figura 3- Procedimentos experimentais: Sequência do experimento: a) Câmera para filmagem dos comportamentos; b) Peixes transferidos para o tanque com aquecedor, termômetros e aerador. c) Modelo do tanque. Fonte: Arquivo pessoal.

### Experimento do aquecimento gradual da temperatura

Cada tanque foi equipado com um aerador de superfície, termostatos (HS300W - Termostato Eletrônico SOBO 127V/60Hz) fixados em sua lateral, um termômetro manual e uma câmera filmadora. Os termostatos foram configurados no modo liga-desliga para regular o aumento gradual da temperatura, por um período de 2°C/h. Os tanques dos grupos controle continham os mesmos itens mencionados, porém o termostato permanecia desligado.

Decorrido as 24h após a transferência para os tanques experimentais, os mesmos foram submetidos ao aumento gradual da temperatura. Após atingir a temperatura desejada para cada tanque experimental, esta permaneceu constante por 60 minutos. Os tanques foram divididos pela determinação de cada temperatura com uma réplica experimental, no qual os animais eram coletados simultaneamente ao grupo que a temperatura estipulada era atingida (Tabela 2). A coleta era efetuada após a finalização do vídeo de 60 minutos de permanência dos peixes em cada temperatura.

Tabela 2: Identificação dos grupos para o experimento.

<b>T1</b>	Controle experimental (20°)
<b>T2</b>	24°C
<b>T3</b>	28°C
<b>T4</b>	32°C
<b>T5</b>	TCS



A TCS determinou a tolerância térmica da espécie em estudo, nesse tanque a temperatura foi elevada a 2° C/h até a observação de alterações comportamentais com colapsos fisiológicos. Ao término de cada experimento, os animais foram eutanasiados e retirado o tecido epitelial (Figura 4) para as análises descritas a seguir. Foi realizado uma amostragem de um grupo de controle ambiental, os 13 peixes foram eutanasiados e seu tecido tegumentar retirado na coleta em campo, posteriormente foram submetidos a todas as análises dos grupos experimentais.

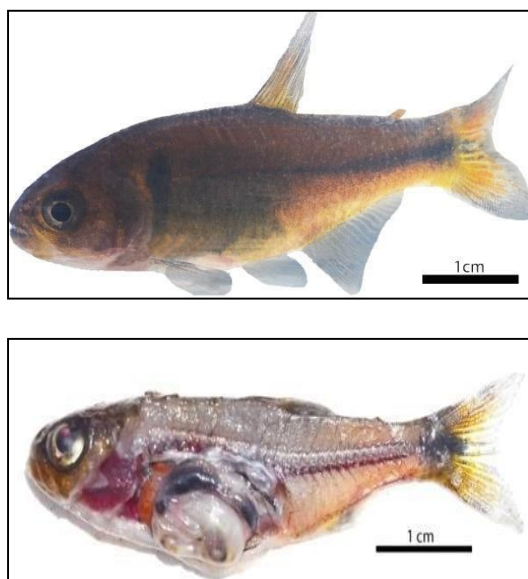


Figura 4: *A. brevirohinus* vivo (superior) e dissecado para coleta de tegumento (inferior). Fonte: Arquivo pessoal.

### Parâmetros físico-químicos da água

O pH, temperatura e oxigênio dissolvido foram mensurados por aparelho multiparâmetro de água portátil (HI 3828; Hanna Instruments Michigan, USA), na coleta ambiental e durante o experimento.

### Análises comportamental

O comportamento foi observado e classificado ao longo de todo experimento dentro de critérios estabelecidos em um Etograma. O etograma é uma lista de comportamentos utilizados para descrever as habilidades de uma espécie em estudo, utilizou-se os seguintes critérios para a avaliação das alterações comportamentais: batimento opercular, equilíbrio e natação. Estipulou uma escala de pontuação 5 a 0 para esses parâmetros, onde 5 caracterizava o



comportamento normal e decrescia à medida da mudança do comportamento, a pontuação 0 indicava a morte (Tabela 2).

Os animais foram filmados durante 60 minutos a partir da estabilização da temperatura de cada tanque, no tanque de TCS, a filmagem foi feita a partir de 35°C até completar os 60 minutos de filmagem, atingindo a temperatura de 37,6°C.

Tabela 3: Etograma de classificação comportamental, utilizando pontuação de 5 a 0 de acordo com os comportamentos observados nos peixes submetidos ao aumento gradual de temperatura.

<b>Pontos</b>	<b>Equilíbrio</b>	<b>Natação</b>	<b>Batimento opercular</b>
<b>5</b>	Normal	Normal	Normal
<b>4</b>	Não foi registrado	Levemente acelerada	Levemente acelerado
<b>3</b>	Distúrbio leve	Acelerada	Medianamente acelerado
<b>2</b>	Desequilíbrio horizontal ou lateral	Natação lenta	Acelerado
<b>1</b>	Decúbito lateral ou ventral	Natação rara com espasmos	Lento
<b>0</b>	Morte	Morte	Morte

Fonte: (SARTORIO, 2013).

As notas foram atribuídas pela observação de uma pessoa a cada 30 minutos durante o experimento. Através dos vídeos feitos durante o experimento, um grupo composto por três diferentes avaliadores analisaram individualmente os comportamentos em intervalos de 5 minutos. Os valores foram somados e calculado a média onde as médias de pontuação foram separadas em fases de acordo com o estudo de Cocking (1959), cada fase descreve as características comportamentais (Tabela 5)

Tabela 4 - Tabela de estudos comportamentais.

<b>Fase</b>	<b>Estágio</b>	<b>Sintomas</b>
<b>Fase I</b>	Estresse inicial	Preferência pela parte superior da coluna d'água, deslizam rápida e verticalmente pelo aquário, colisões com a parede, desequilíbrio, coloração mais escura, rajadas de velocidade.
<b>Fase II</b>	Perda de controle	Boiam lateralmente ou horizontalmente, corpo rígido com movimentos oculares e das nadadeiras peitorais, movimento opercular rápido.
<b>Fase III</b>	Morte	Sem movimentos, apenas com movimentação opercular, que no caso é a última a cessar.

Fonte: Adaptado de Cocking (1959).

### **Análises histológica**

Após a extração do fragmento do tecido epitelial dos peixes de cada grupo, os tecidos foram processados em dois fixadores: o paraformaldeído 4% por 24h, posteriormente transferidos para Solução de tampão fosfato 0,1 M e Solução de Bouin por 4h, posteriormente transferidos para álcool 50°.

### **Preparação dos blocos para microscopia**

Posteriormente à fixação as amostras foram desidratadas em série crescente de álcool e diafanizadas em xilol, em seguida foram infiltradas em parafina histológica I a 60°C, posteriormente para a parafina histológica II (Anexo I). Foram confeccionados blocos de 2x3 cm. As amostras foram cortadas em micrótomo (YD-355AT) com 5 µm de espessura para a

confecção das lâminas, as lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por 2h na posição horizontal para desparafinação e maior aderência do corte à superfície.

### **Coloração e microscopia de luz**

Os tecidos foram corados para melhor compreensão das estruturas, pela técnica de Hematoxilina/Eosina (HE) que permite identificar os componentes celulares acidófilos (núcleo e proteínas) corados pela hematoxilina com tons azulados/arroxeados e basófilos (citoplasma e fibras colágenas), corados pela eosina em tons rosados/avermelhado. O xilol foi utilizado para completar a desparafinação, com sequências de banhos de álcool para a reidratação, posteriormente foram seguidos os protocolos de coloração (Anexo II). A montagem da lâmina foi finalizada por lamínulas fixadas com Permount®, após 72h foram analisados pela microscopia de luz e fotografados em foto microscópio (Labomed, Lx400p).

### **Imuno-histoquímica**

A imuno-histoquímica permite a identificação, localização e quantificação de proteínas em células por meio de reações de anticorpos específicos. Para realização do método, as lâminas foram previamente sinalizadas em solução de 3-aminopropiltietoxi-silano 4% (Anexo III). Este procedimento promove uma maior aderência dos fragmentos de tecido à lâmina, é necessário, pois a imuno-histoquímica é uma técnica que demanda um longo período, além de ser um protocolo muito agressivo aos tecidos.

Para o estudo da imuno-histoquímica foram confeccionadas lâminas com 3 cortes de 5µm do tecido tegumentar submetidos ao experimento e ao controle ambiental. Por se uma técnica longa, ela foi dividida em três dias: dia 0, dia 1 e dia 2 descritos a seguir. As diluições que melhor revelaram a reação imuno-histoquímica foram as de 1:10000 para o VEGF.

**- Dia 0:** O dia zero se caracteriza para a organização do procedimento, são separados todos os materiais utilizados e preparadas todas as soluções. Foram feitos dois tampões, o Tampão PBS (pH 7,2 – 7,4) e o Tampão Citrato (pH – 6,0 – 10 Mm). As lâminas foram separadas e colocadas em estufa a uma temperatura de 37°C (over night). Os anticorpos escolhidos são separados, são feitos os cálculos para cada tecido de cada lâmina. Organizam-se os materiais: metanol, peróxido H, o banho maria em temperatura de 95°C, papel toalha, pipetas/ponteiras, hematoxilina, caneta histológica, câmara húmida e luminária.

**- Dia 1:** Os tampões foram retirados da geladeira para atingir temperatura ambiente, o metanol colocado no congelador. Em seguida foi organizada a bateria de imuno. O banho-maria foi

mantido a temperatura de 95°C e uma cubeta contendo Tampão citrato colocada dentro do banho para alcançar a temperatura igual à do banho.

As lâminas foram retiradas da estufa, submetidas a banhos de Xilol (I e II) para desparafinação e reidratados em sequências de álcool. Em seguida, foram colocadas na cubeta e no Tampão Citrato em temperatura de 95°C por 30 minutos para a recuperação dos antígenos bloqueados pela ação dos fixadores. Após esse tempo a cubeta é retirada e deixada em temperatura ambiente por 20 minutos. Durante esse intervalo é calculado a quantidade necessária para fazer o bloqueio da peroxidase endógena, a solução é preparada a 3% em metanol. As lâminas passam por água destilada, em seguida são banhadas por PBS. Todas as lavagens das lâminas com esses tampões e água foram realizadas em cubetas histológicas sob leve agitação, trocados três vezes por 5 minutos cada. Em seguida solução do bloqueio da peroxidase endógena, uma solução bloqueadora, na qual atua na inativação de todas as enzimas peroxidases presentes no tecido, foi colocada na cubeta e mantida no freezer por 30 minutos.

As soluções que serão descritas foram pipetadas sobre cada corte de cada lâmina, para cada corte 30µl a 50µl de solução dentro do limite circulado por uma caneta histológica. Para essa pipetagem as lâminas foram colocadas em posição horizontal numa câmara úmida contendo água destilada.

Após a remoção da primeira solução bloqueadora, as lâminas foram banhadas em PBS com três trocas e 5 minutos cada, foram secados os tecidos com papel filtro e delimitado um círculo com a caneta histológica. Logo em seguida foi aplicada aos cortes a segunda solução bloqueadora de proteínas (Protein Block DAKO X0909), agindo como bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido, pipetada em todos os tecidos, permaneceu à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente o anticorpo primário foi diluído com PBS e pipetado em dois tecidos de cada lâmina, deixando o primeiro corte como controle negativo. As lâminas foram incubadas na geladeira durante 20h com o anticorpo primário.

**- Dia 2:** A câmara úmida é retirada da geladeira para a finalização do protocolo.

O anticorpo primário é retirado dos tecidos pela rinsagem das lâminas em PBS, em seguida são banhadas por 5 minutos em três trocas do mesmo tampão. Após os banhos, os cortes são secados com papel filtro e o anticorpo secundário é pipetado em todos os cortes, permanecendo durante 30 minutos. Em seguida as lâminas são banhadas novamente em PBS, são feitas três trocas e cada troca por 5 minutos, são rinsadas em água destilada. Os tecidos receberam o cromógeno DAB, o qual reage com as proteínas produzindo assim uma coloração marrom acastanhada. O DAB é pipetado em todos os tecidos durante 2 minutos, cada lâmina recebe o

DAB duas vezes e posteriormente são banhadas em água destilada por 5 minutos, são feitas duas trocas. Para a coloração do tecido utilizou-se hematoxilina (10 segundos).

As lâminas então foram banhadas em água corrente por 20 minutos e desidratadas em sequência de álcool por 2 minutos cada. Após a desidratação, as lâminas foram banhadas por Xilol (I e II) por 2 minutos cada e permaneceram no Xilol III até a montagem com lamínula fixada por permount. Após 48h foram foto micrografadas em um microscópio (Labomed, LC400p). Todo o protocolo da imuno-histoquímica é encontrado detalhadamente no anexo IV.

### **Análises de parâmetros redox**

Essas amostras foram fixadas em nitrogênio líquido e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , divididas em três réplicas de acordo com cada temperatura do experimento e identificadas para cada análise de parâmetro redox (Tabela 3).

Tabela 5: Identificação dos grupos para o procedimento de estresse oxidativo.

<b>T1</b>	Controle ambiental ( $20^{\circ}$ )
<b>T2</b>	Controle experimental ( $20^{\circ}$ )
<b>T3</b>	$24^{\circ}\text{C}$
<b>T4</b>	$28^{\circ}\text{C}$
<b>T5</b>	$32^{\circ}\text{C}$
<b>T6</b>	TCS

Após a organização, as amostras foram descongeladas e imersas no gelo momentos antes dos ensaios. Os parâmetros de estado redox avaliados foram os seguintes:

- Dano oxidativo a lipídios, pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Dano oxidativo a proteínas, pela mensuração do conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas;
- Atividade da catalase;
- Atividade da superóxido dismutase
- Capacidade antioxidante total, determinada pelo poder de redução do ferro (FRAP).

Os mesmos materiais, reagentes e equipamentos (pipetas, provetas, balança analítica, pHmetro, dentre outros) foram utilizados na repetição (T1-T6) do mesmo procedimento.

### **Preparo da amostra – Maceração**

As amostras foram maceradas em um macerador de tecidos Potter-Elvehjem (Corning) mantido no gelo, em PBS (0,15M, pH 7,34) gelado. O homogenato foi dividido em três alíquotas. A primeira alíquota foi centrifugada (Thermo Electron. Led GMBH D37520, Alemanha) a 5000 g, por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi retirado à avaliação TBARS e à capacidade antioxidante não enzimática. O sedimento foi utilizado para a mensuração do conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas. A segunda alíquota foi centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para a medida da atividade das enzimas SOD e CAT, como parâmetro da capacidade antioxidante enzimática. As alíquotas para cada ensaio foram mantidas no gelo enquanto aguardavam dosagem.

### **Análise da peroxidação lipídica**

A reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica, foi utilizada para determinar a concentração de TBARS. Alíquotas do homogenato (0,230 ml) foram adicionadas a 20 ml de ácido acético (2,5 M, pH 3,4), 0,1 ml de duadecil sulfato de sódio (8,1%) e 0,25 ml de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida a 95 °C durante 90 minutos. Decorrido esse período, as amostras foram resfriadas e centrifugadas durante 5 minutos, a 5000 g (Thermo Electron. Led GMBH D37520, Alemanha) e 0,25 ml do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços de fundo chato. Na sequência, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 532 nm em leitor de microplacas (SpectraMax®190, Molecular Devices, EUA). A concentração de TBARS nas amostras foi determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de MDA (1,1,3,3 – tetrametoxipropano - Sigma, EUA) e expressa em nmol MDA/mg proteína. As medidas foram realizadas em duplicata.

### **Derivados carbonílicos em proteínas**

O sedimento do homogenato de cada um dos tecidos foi suspenso em 1 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,7, contendo 1 mM de ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA). Em seguida, cada amostra foi homogeneizada e dividida em branco e teste. Foi adicionado ácido tricloroacético 10% a todas as amostras que, então, foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se, ao sedimento do teste 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mM) (Sigma-Aldrich®, EUA) diluído em ácido clorídrico 2mM. Ao branco foi adicionado apenas HCl 2 mM. As amostras foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos e homogeneizadas com o vórtex a cada 15 minutos.

Após esse período foi adicionado ácido tricloroacético 10% às amostras, que foram homogeneizadas e centrifugadas a 5000 g, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado lavado em 1 ml de etanol e acetato de etila (1:1) e centrifugado a 5000 g, por 10 min e a 4°C, por duas vezes. Por fim o sedimentado foi dissolvido em SDS 6% e centrifugado a 10000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi avaliado espectrofotometricamente a 370 nm, em placa de 96 poços, em leitor de microplacas, em triplicata.

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas foi determinada utilizando a equação de Lambert Berr:  $A=c.b.\epsilon$ . Onde A é a diferença entre a absorbância do teste e do branco, c é a concentração, b é o caminho óptico e  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar. O coeficiente de extinção molar para o DNPH a 370 nm é 22000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e o caminho óptico neste ensaio foi de 0,73 cm. O conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas foi expresso como nmol de derivados carbonílicos por mg de proteína (nmol/mg prot.)

#### **Atividade da enzima CAT**

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada pelo decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio a 240nm. As amostras foram adicionadas a uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,03 M (Sigma, EUA). A reação de decomposição do peróxido de hidrogênio foi acompanhada durante 1 minuto, a 25°C, espectrofotometricamente, a 240 nm (Double beam spectrophotometer visible UV, CE-Libra S22, Faotuo) em cubetas de quartzo. A atividade da catalase foi expressa em milimolar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto por minuto por miligrama de proteína ( $\Delta E/\text{min}/\text{mg prot.}$ ). As medidas foram realizadas em triplicata.

#### **Atividade da enzima SOD**

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada pela inibição da autooxidação do pirogalol. As amostras de cada tecido foram adicionadas a tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 8.2, 37 °C) contendo 1 mM de ácido dietilenotriaminopenta-acético (Sigma, EUA) e a reação foi iniciada por adição de pirogalol (1,2,3-benzenotriol, Sigma, EUA) a 0,2 mM. A reação foi determinada espectrofotometricamente em leitor de microplacas a 420 nm, 37°C, durante 4 minutos. A atividade da SOD foi expressa em U/mg proteína, onde uma unidade de enzima é a quantidade que causa inibição da autooxidação do pirogalol em 50%. As medidas foram realizadas em duplicata.

### **Capacidade antioxidante não enzimática**

A capacidade antioxidante não enzimática das amostras foi determinada pelo método FRAP. A capacidade de redução do complexo da forma  $\text{Fe}^{3+}$  -ferritripiridiltriazina (TPTZ) para a forma  $\text{Fe}^{2+}$  -TPTZ pelos antioxidantes não enzimáticos do homogenato, em pH ácido, vai determinar o poder antioxidante da amostra. Para a confecção do reagente FRAP, 25 ml de tampão acetato de sódio (0,3 M, pH 3,6) foram acrescentados a 2,5 ml de TPTZ (10 mM, Sigma-Aldrich®, EUA) e depois misturados a 2,5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20 mM). A uma alíquota de 528  $\mu\text{l}$  do reagente FRAP foi adicionado 72  $\mu\text{l}$  do homogenato. Essa mistura foi homogeneizada e incubada no escuro, a 37 °C, por 30 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas a 300 g por 5 min, e o sobrenadante foi analisado espectrofotometricamente, em duplicata, em leitor de microplacas, a 593 nm. A capacidade antioxidante total das amostras foi expressa em equivalentes de  $\text{Fe}^{2+}$ , determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de  $\text{FeSO}_4$  e normalizada pela quantidade de proteína na amostra. Os resultados foram expressos como M  $\text{FeSO}_4$ /mg de proteína.

### **Dosagem de proteínas**

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de quantificação de Bradford (Coomassie blue assay). Albumina de soro bovino (BSA, 1mg/ml) foi utilizada para construção de uma curva com concentrações conhecidas de proteína (curva padrão). A leitura, em triplicata, foi realizada espectrofotometricamente em leitor de microplacas (SpectraMax®190, Molecular Devices, EUA) a 590 nm e os valores de proteína determinados pelo Software Softmax Pro® (V5.4, molecular Devices, EUA) em mg/ml.



## 5 RESULTADOS

### Parâmetros físico-químicos da água

Os valores aferidos no início e término do experimento de cada tanque apresentaram diferenças na concentração de oxigênio dissolvido (OD) e no pH entre grupos testes e controle. Os níveis de oxigênio dissolvido comparados entre os grupos experimentais mostraram que o tanque de temperatura 24°C foi o que mais teve decréscimo de OD, seguido pelos tanques de temperatura 28°C e TCS. O tanque de 32°C permaneceu com a concentração de OD próxima a concentração inicial. Nos tanques controles na qual a temperatura permaneceu constante em 20°C observou-se pequena queda na concentração do OD, considerado insignificante.

O pH inicial e final do grupo TCS foi o que apresentou resultado discrepante se comparado aos outros grupos, uma vez que esse peixe possuem uma faixa de pH 6,2 - 7,5 considerada dentro da normalidade. Os outros grupos e os controles se mantiveram com o pH neutro (Tabela 4).

Tabela 6: Níveis de OD e pH dos tanques experimentais.

Tanques	OD% Inicial	OD% Final	pH Inicial	pH Final
<b>T24</b>	88,6%	73%	6,85	6,6
<b>T28</b>	87,3%	77,5%	6,81	6,2
<b>T32</b>	87,9%	87%	6,58	6,41
<b>TCS</b>	88,4%	79,3%	6,79	5,27
<b>C24</b>	82,6%	82%	7,1	7
<b>C28</b>	85%	83,6%	6,95	6,59
<b>C32</b>	87%	85%	6,41	6,35
<b>CTCS</b>	87.1%	86,8%	6,96	6,88

T: temperatura; C: controle; TCS: temperatura crítica de sobrevivência. Fonte: Autor.

### Análise comportamental

As análises dos parâmetros comportamentais como o equilíbrio, a natação e o batimento opercular sofreram alteração em função da variação da temperatura, na qual a TCS (37,6°C) apresentou maior influência (Figura 5). Desde a primeira temperatura de 24°C foram registradas alterações no comportamento dos peixes, essas alterações foram aumentando gradualmente assim como as temperaturas, gerando um decréscimo na pontuação dos parâmetros estabelecidos. Entre as temperaturas 28° e 32°C os peixes apresentaram alterações como a perda de equilíbrio, natação e batimento opercular acelerado. Na temperatura crítica de sobrevivência, as alterações foram mais severas como o decúbito lateral, desequilíbrio vertical, natação lenta, espasmos, alteração da coloração e redução total das atividades de alguns indivíduos. O comportamento do grupo controle (20°C), foi considerado normal durante todo o experimento e período de observação, correspondendo a pontuação total igual a 15 pontos. A média final dos parâmetros analisados estão representadas na Figura 6.

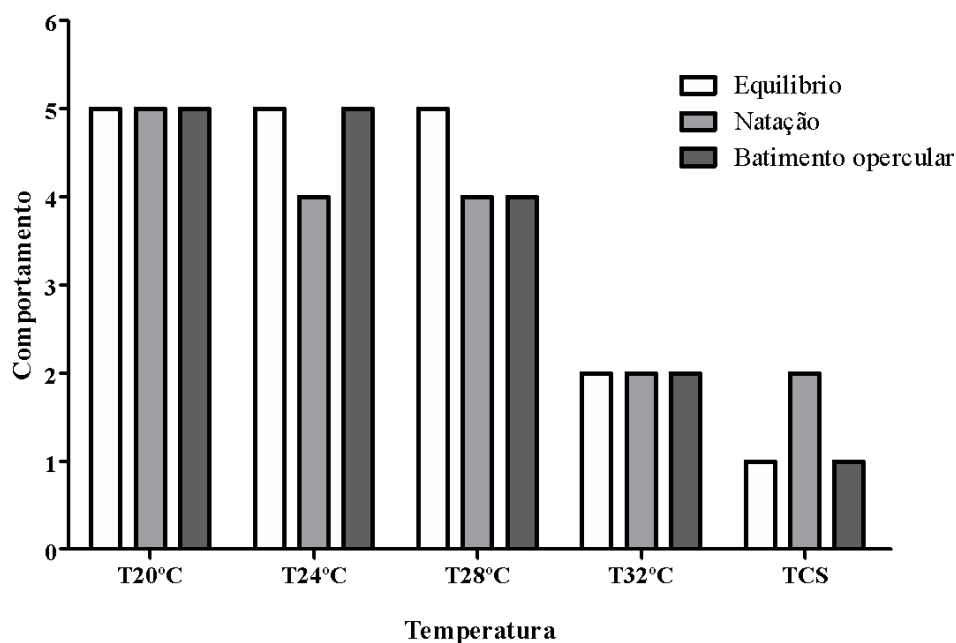


Figura 5: Médias das pontuações atribuídas a cada um dos parâmetros comportamentais de cada grupo submetidos a diferentes temperaturas. Fonte: Autor.

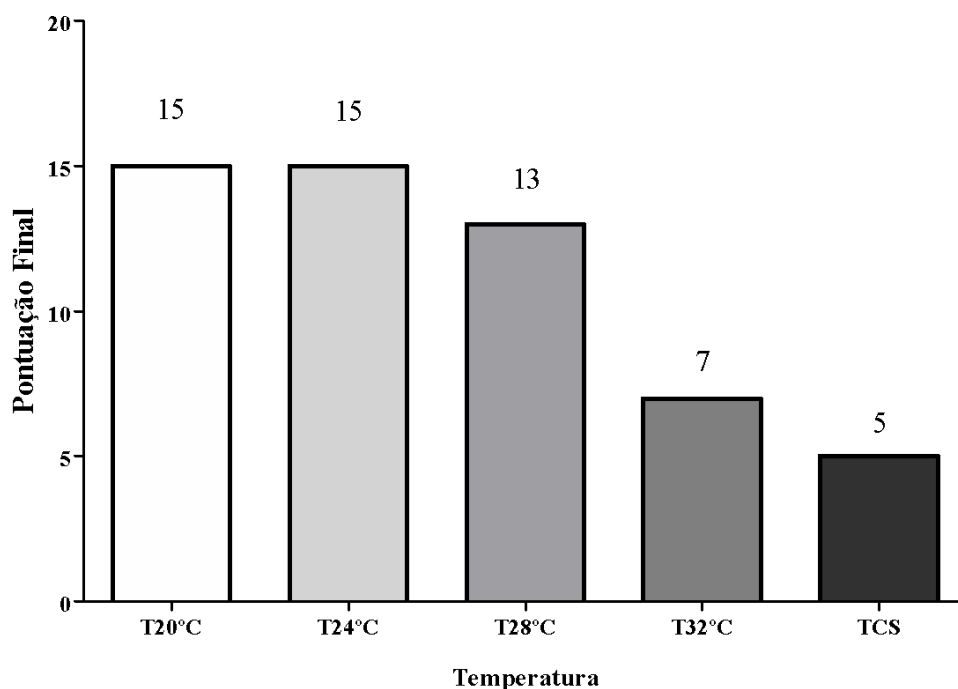


Figura 6: Média das pontuações comportamentais (equilíbrio, natação e batimento opercular) entre os grupos avaliados a cada temperatura. Fonte: Autor.

## Análises histológica

### Estrutura geral da pele

Localizada recobrindo todo o corpo do peixe, a pele do *Astyanax brevirohinus* possui escamas, apresenta coloração distinta com grande concentração de cromatóforos em toda região do corpo (Figura 7). A região analisada (latero-caudal) é constituída por um tecido epitelial estratificado, seguido por uma derme espessa. A derme é formada por uma camada de tecido conjuntivo frouxo e logo após por tecido conjuntivo denso, onde se origina a escama.

### Epiderme

A epiderme do *Astyanax breverhinus*, consiste de um epitélio estratificado, composto basicamente de quatro tipos celulares principais, morfologicamente distintos: células epiteliais, células de muco (caliciformes) (Figura 7C), células de alarme (claviformes) (Figura 7C) e células de pigmentação ou cromatóforos (melanóforos) (Figura 7D). O tecido epitelial encontra-se organizado em duas regiões: estrato superficial e basal (Figura 7A), a escama é presente entre essas regiões (Figura 7B). O estrato superficial é constituído por camadas que contém células de muco, células de alarme e as células epiteliais. O estrato basal, estruturado

sobre a derme, é formado por uma camada de células epidérmicas e células de pigmento (melanóforos) (Figura 7D).

### **Célula Epitelial**

As células epiteliais são pequenas, estão distribuídas no estrato superficial e basal da epiderme com camadas sobrepostas, apresentadas em formato de cubo achatado. Possui um núcleo pequeno, central e cromatina condensada. Elas formam camadas que estão distribuídas entre as células de alarme, as células de muco e às escamas, presentes por toda a epiderme. (Figura 7A).

### **Célula de Muco**

As células de muco foram observadas distribuídas ao longo da camada superficial do epitélio. Encontram-se concentradas, geralmente, em uma camada contínua de células com sua porção apical secretora aberta para a superfície da pele através de um poro. São células pequenas e possuem formato esférico, elas são observadas pela perda de sua coloração após o procedimento de HE (Figura 7C).

### **Célula de Alarme**

As células de alarme se encontram organizadas no estrato superficial, são distintas morfologicamente das células de muco, possuem formato irregular com cromatina pouco condensada. Caracterizam-se por seu tamanho volumoso e apresentam formato globular, podem ser mono ou binucleadas, quando binucleadas estes são próximos e posicionados na porção central. Diferentemente das células de muco, as células de alarme não apresentaram abertura para a superfície do epitélio (Figura 7C).

### **Célula de pigmentação (melanóforos)**

São células que se originam na derme, com formato irregulares, núcleo esférico, central e seu citoplasma contém abundante grânulos de pigmento. Estas células podem se diferenciar no tipo de pigmento que define a cor ao peixe, nessa espécie se diferencia em melanóforo (Figura 7D).

## Derme

A derme se encontra abaixo do epitélio, formada por uma camada de tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos e melanóforo associados. Posteriormente a esse tecido conjuntivo frouxo encontra uma espessa camada de tecido conjuntivo denso não modelado presos em fibras de colágeno. A derme é paralela a epiderme, as escamas e as células pigmentares (melanóforos) (Figura 7D).

## Escama

Nessa espécie se encontram escamas do tipo ciclóide, pequenas e arredondadas em sua ponta com superfície lisa. A escama tem origem na derme estrato basal que se recobre de células epiteliais e a outra extremidade está localizada no estrato superficial da epiderme. (Figura 7A e B).

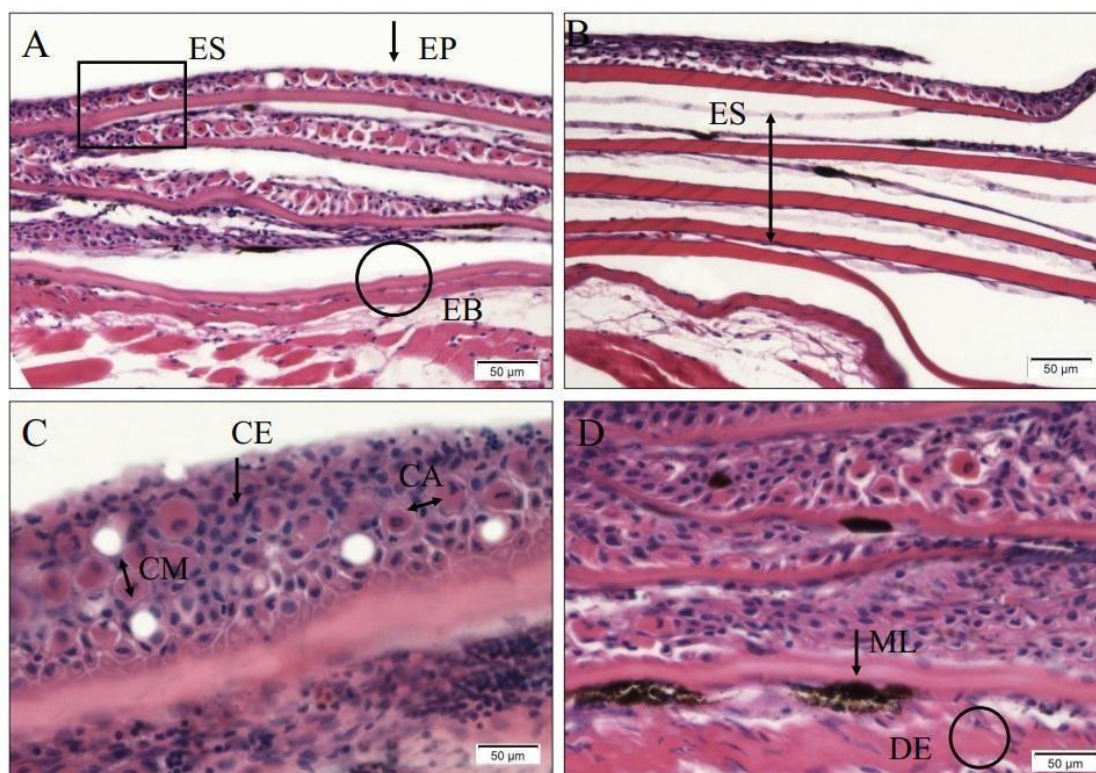


Figura 7: Microscopia do tegumento de *A. brevirostris*. Coloração HE, aumento 20x. A: Estrato superficial (ES), estrato basal (EB), epiderme (EP). B: escamas (ES). C: células epiteliais (CE), células de muco (CM), células de alarme (CA). D: melanóforo (ML), derme (DE). Fonte: Autor.

## Histopatologia

A análise histopatológica do tecido tegumentar dos animais do controle ambiental (CA) e controle experimental (CE) demonstrou que estes testes não sofreram nenhuma modificação na estrutura celular. Os tecidos dos animais submetidos a temperatura de 24°C apresentaram edema (Figura 8A), rompimento da camada epitelial e presença de infiltrado de células de defesa (neutrófilos) (Figura 8B). No estrato superficial apresentou aumento do número de melanóforos e de células de muco, na camada basal, a derme apresentou afrouxamento das fibras colágenas (Figura 8C).

Nas temperaturas de 28°C e 32°C, no estrato superficial observamos inflamação aguda (Figura 8B), regiões com presença de melanóforos, células de defesa, ausência das células de muco, além da modificação na morfologia do tecido, visto que as camadas apresentaram desmembramento tecidual. Os indivíduos que atingiram sua TCS observamos lesões mais intensas, apresentaram inflamação e edemas e áreas de necrose, além da presença de melanóforos em algumas regiões e ausência das células de muco (Figura 8D). Nessas temperaturas o estrato basal, a derme apresentou edema e afrouxamento das fibras colágenas.

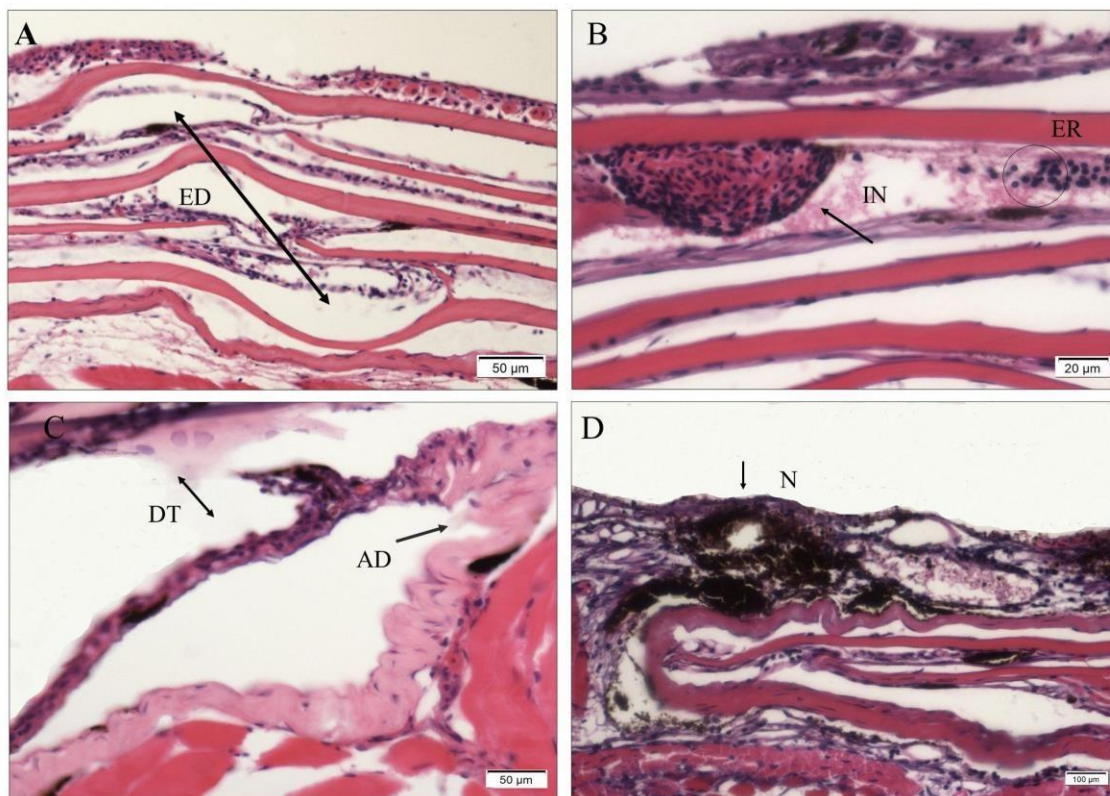


Figura 8: Histopatologia do tegumento *A. brevirostris* com aumento gradual de temperatura. Coloração HE, aumento 10x/20x. A:T24°C-Edema(ED). B:T 28°C-Infiltrados inflamatórios(IN), neutrófilos (NE). C:T 32°C-Desmembramento tecidual(DT), afrouxamento da derme(AD). E:TCS Células com aspecto necrótico(N). Fonte: Autor.

### **Imuno-histoquímica**

O controle negativo, no qual não foi adicionado o anticorpo primário, não reagiu a expressão da proteína VEGF. Dessa forma, esses controles, se não marcados, demonstram a confiabilidade dos resultados especificidade da reação (Figura 9A). A expressão da proteína VEGF foi evidente na epiderme, no substrato superficial em todas as temperaturas, sendo negativo na escama e na derme.

Na temperatura 24°C houve o espessamento do substrato junto com o recrutamento das proteínas VEGF nas células epiteliais, originando micro vascularização (Figura 9C). A temperatura de 28°C mostrou uma maior expressão do VEGF, com presença de vários vasos pelo substrato (Figura 9D). Na temperatura de 32°C, a camada epitelial também se torna mais espessa, com expressão do VEGF evidente no citoplasma das células de alarme (Figura 9E). O pico da expressão proteica foi na TCS, os vasos (Figura 10F) começam a se fundir, ficam próximos e dilatados com as camadas mais profundas expressando mais VEGF do que as camadas superficiais (Figura 9F). Observamos as camadas superficiais com grande acúmulo de muco o que resultou no espessamento deste substrato.



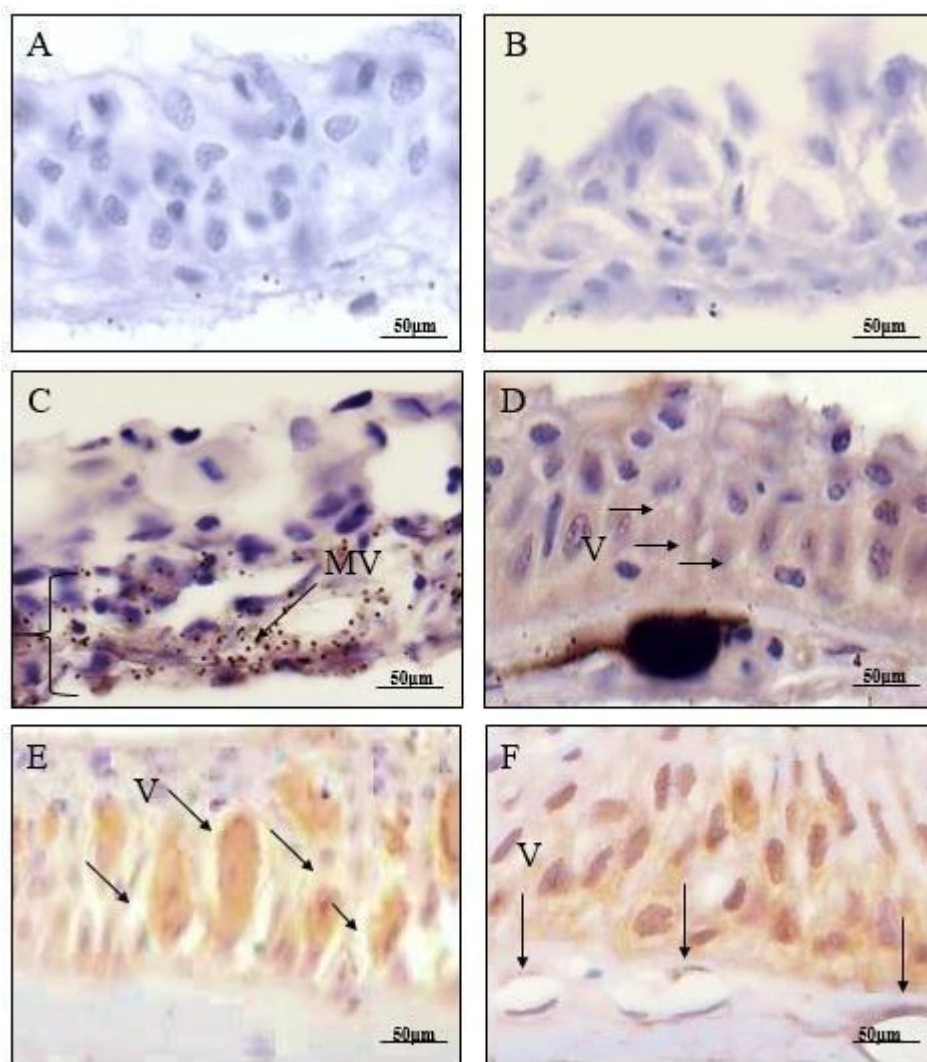


Figura 9: Fotomicrografias da expressão do anti-VEGF – 1:10000 *A. brevirhinus* submetidos a técnica de imuno-histoquímica e contracoradas com Hematoxilina. A: Controle Negativo. B: T20°C- Controle experimental. C: T24°C- MV: Micro vascularizações. D: T 28°C- V: Vasos. E: T32°C- V: Vasos. F: TCS – V: Vasos. Fonte: Autor.



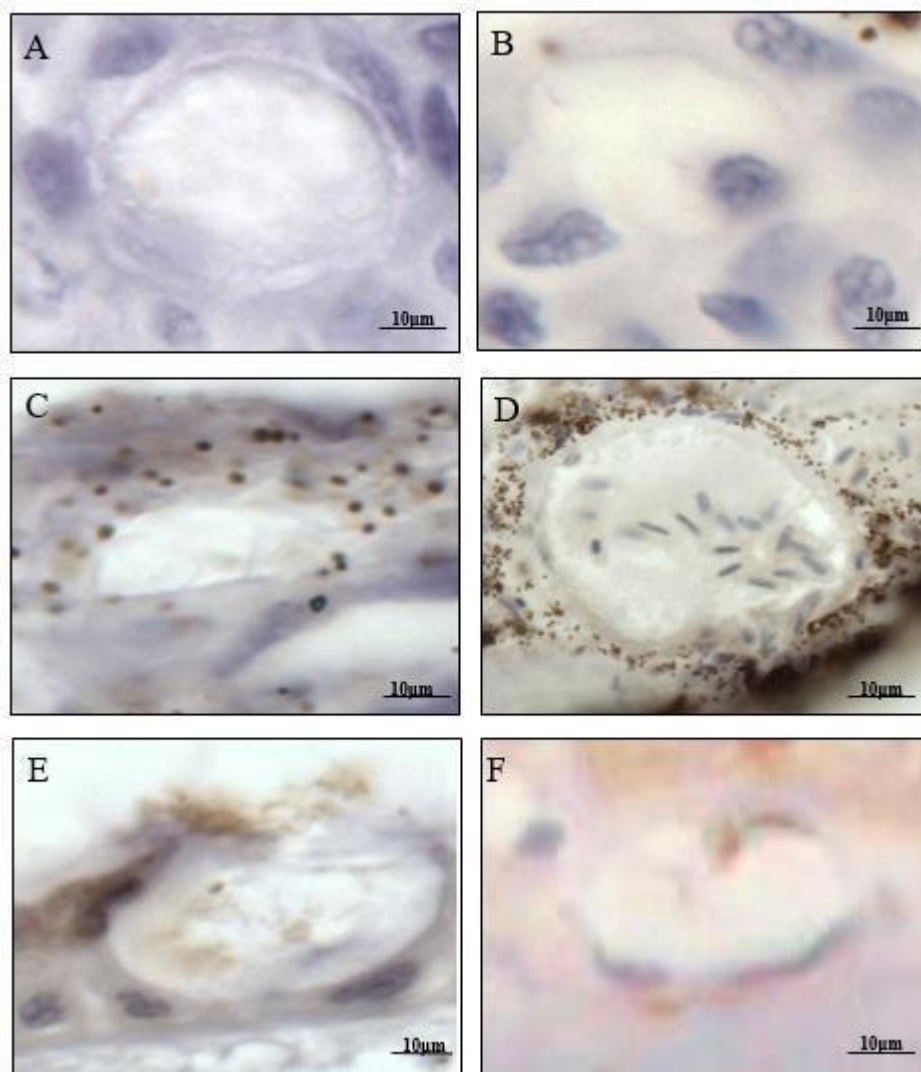


Figura 10: Fotomicrografias da expressão anti-VEGF – 1:10000 de *A. brevirhinus* submetidos a técnica de imuno-histoquímica e contracoradas com Hematoxilina. A: Controle Negativo. B: T20°C- Controle experimental. C: T24°C. D: T 28°C. E: T32°C. F: TCS. Vasos. Fonte: Autor.

### Parâmetros redox

Este estudo investigou respostas quantitativas de biomarcadores do estado redox e expressão das enzimas antioxidantes e enzimas antioxidantes não enzimáticas sobre o efeito do aumento gradual da temperatura do tecido tegumentar dos peixes, uma vez que houve alterações na concentração dos biomarcadores TBARS, da enzima antioxidante SOD antioxidante não enzimático FRAP

O biomarcador TBARS quantificou os produtos da peroxidação lipídica, quando o MDA reagiu com o ácido tiobarbitúrico. As respostas dessa reação mostraram que a partir da temperatura de 24°C até 28°C a concentração aumentou consideravelmente, se estabilizando na temperatura de 32°C, observando a maior concentração entre essas duas temperaturas: T32°C e TCS, apontando que o aumento gradual da temperatura nesses organismos promove a peroxidação lipídica neste tecido (Figura 11).

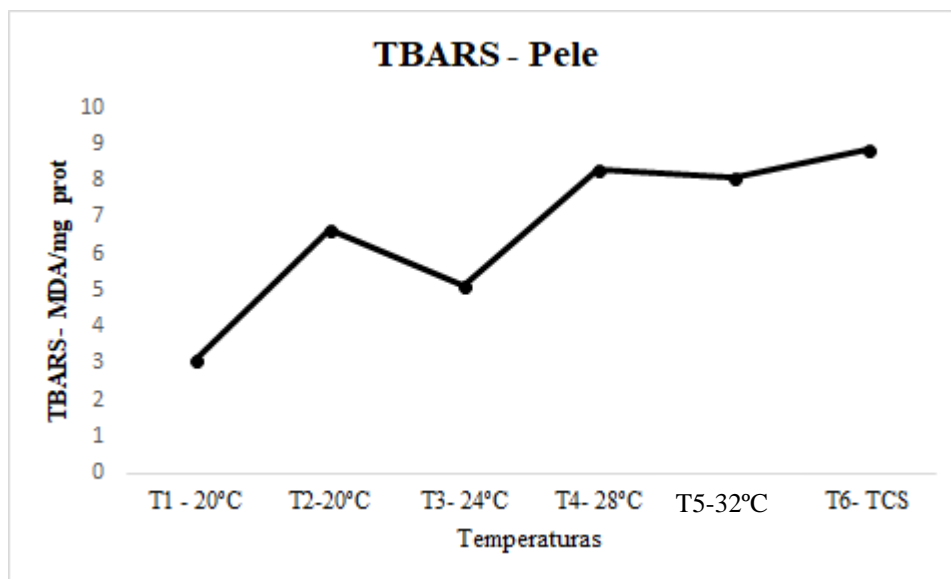


Figura 11: Efeito do aumento gradual da temperatura nas concentrações de TBARS no tecido tegumentar (Concentração: MDA/mg prot.). Fonte: Autor.

O antioxidante não enzimático, o FRAP, determinou a redução do ferro em fluidos biológicos no qual o complexo férrico-tripiridiltriazina é reduzido ao complexo ferroso na presença de um antioxidante em condições ácidas, mostrou neste experimento a eficiência de um antioxidante nas temperaturas de controle ambiental/experimental e no TCS, nas outras temperaturas (24°C a 30°C) a ação foi diminuída (Figura 12).

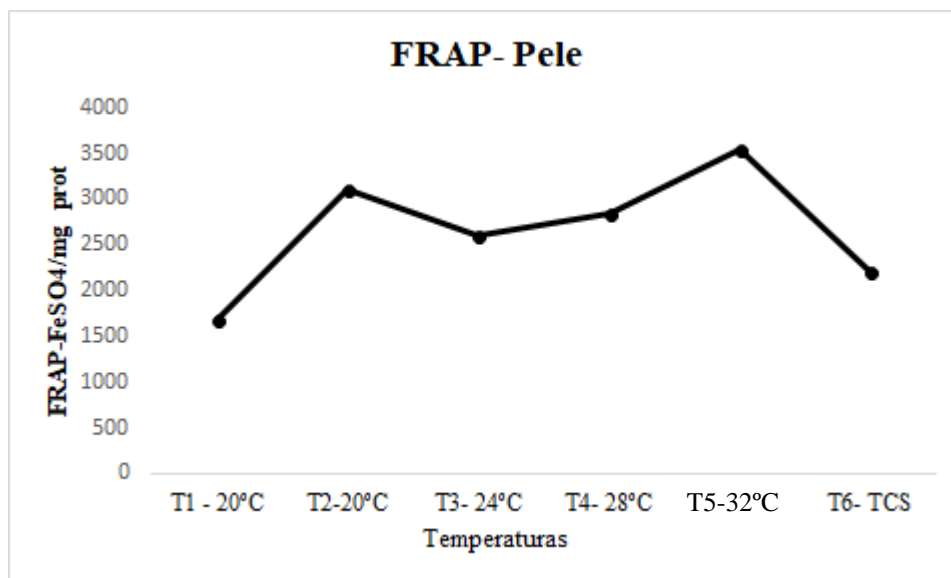


Figura 12: Efeito do aumento gradual da temperatura na capacidade antioxidante não enzimático -FRAP (Concentração:  $\mu\text{m FeSO}_4/\text{mg}$  de proteína). Fonte: Autor.

A enzima antioxidante SOD que faz parte do sistema antioxidante dos seres vivos, com capacidade de neutralizar a ação das espécies reativas do estado redox, teve resultados baixos na temperatura inicial de 24°C, aumentando a capacidade antioxidante na temperatura 28°C se mantendo constante até os 32°C quando houve outro decaimento no TCS. A atividade enzimática da SOD foi maior nos animais em temperaturas consideradas de maior estresse térmico, comparado ao controle (Figura 13). A concentração de proteína carbonilada e antioxidante enzimático CAT não reagiram no ensaio feito com o tecido estudado.

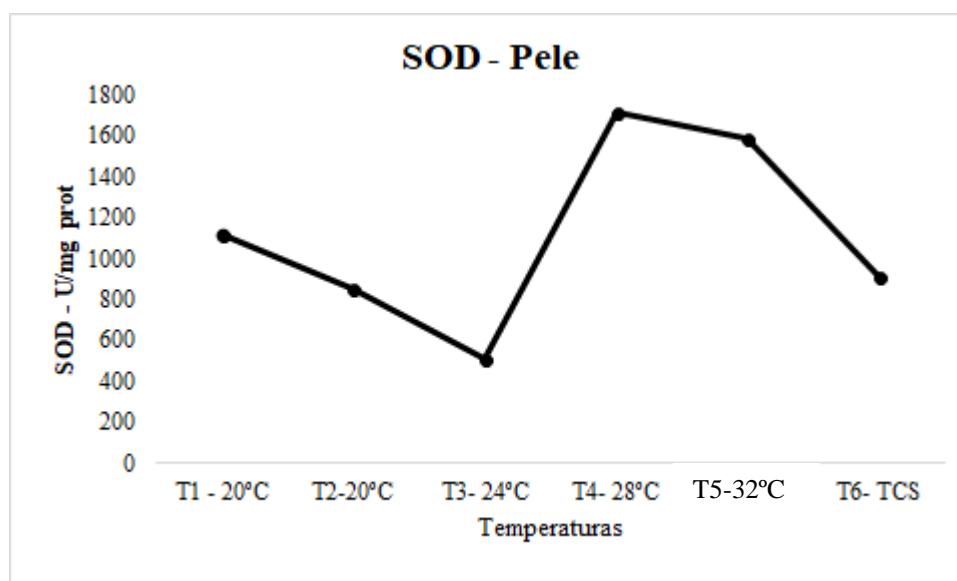


Figura 13: Efeito do aumento gradual da temperatura na capacidade antioxidante total -SOD (Concentração: U/mg prot.). Fonte: Autor.

## 6 DISCUSSÃO

### Parâmetros físico-químicos da água

Devido a temperatura influenciar diretamente na concentração do oxigênio dissolvido, dentre os grupos submetidos ao aumento gradual de temperatura, o tanque com o grupo de 24°C apresentou diminuição da concentração de OD, o que provavelmente tem relação com uma maior demanda por oxigênio na água por ser a primeira temperatura alcançada no qual os peixes provavelmente começaram a encontrar estratégias para manter suas funções fisiológicas, entretanto, nenhum tanque experimental apresentou valores de OD considerados críticos.

A análise físico-química, como a temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade são utilizados para avaliar a qualidade da água em ecossistemas aquáticos (MACDONALD ET AL., 2000; PANDEY *et al.*, 2003).

Oxigênio dissolvido é a concentração de oxigênio (O<sub>2</sub>) contido na água, sendo essencial para todas as formas de vida aquática. A quantidade de oxigênio presente na água em condições normais, depende da temperatura, da quantidade de sais presentes e da pressão atmosférica, uma vez que a temperatura é o fator mais importante no controle da solubilidade do O<sub>2</sub> (FIORUCCI, 2005).

Na maioria dos grupos observou-se o pH ácido, porém dentro do limite da faixa de tolerância, o grupo que teve o pH considerado crítico e fora dessa faixa de tolerância é o grupo submetido a TCS, com pH 5,27. O pH, um parâmetro químico muito importante possui um efeito direto sobre o metabolismo e os processos fisiológicos de organismos aquáticos. A faixa de tolerância de pH para os peixes possui como índice ideal entre 6.5 e 8.0 (WURTS & DURBOROW, 1992). A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais está diretamente relacionado aos efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies, nesse tipo de ambiente, ácidos e bases fortes em altas concentrações.

A escassez de conhecimentos sobre a biologia das espécies e as alterações naturais ou provocadas na qualidade da água, conduz as alterações biológicas de uma espécie. Como foi mostrado nesse experimento, uma vez que alterações da temperatura resultaram nas alterações dos parâmetros físico e químicos da água que são essenciais na sobrevivência desses organismos.

### **Análise comportamental**

A temperatura é o fator abiótico que mais afeta a vida de um organismo ectodérmico, ela pode interferir na atividade reprodutiva, na integridade estrutural, funcional e bioquímica (OLIVEIRA, 2003). O ambiente aquático é extremamente dinâmico e os animais que vivem nesse ambiente enfrentam alterações dificilmente enfrentadas pelos animais terrestres como mudanças rápidas e extremas na concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido, pH e salinidade, o que podem ocasionar estresse e reduzir a habilidade para manter a homeostase (MARIANO, 2006; OBA, *et al.* 2009).

Animais expostos a temperaturas inferiores ao seu ótimo têm a sua taxa metabólica basal, já animais expostos a temperaturas acima do seu ótimo respondem a um maior desvio energético para obtenção de oxigênio, dessa forma a elevação da temperatura é normalmente acompanhada do aumento da taxa metabólica (consumo de oxigênio) (SCHMIDT-NIELSEN, 1997). Isso foi observado nas temperaturas experimentais submetidas neste estudo, pois os animais começaram a apresentar comportamentos que buscavam o equilíbrio de suas funções biológicas, aumentando gradativamente o ritmo de natação e batimento opercular, eventos que podem ser caracterizados como estratégias de fuga daquele ambiente (GUALHARDO & OLIVEIRA, 2006)

A partir da temperatura 28°C os peixes estavam com a natação acelerada e batimento opercular alterado. De acordo com MURUGAIN (2004), a natação acelerada e o aumento da atividade opercular acontecem para atender a demanda de oxigênio pelos tecidos, ao aumento da taxa metabólica. Na temperatura de 32°C observamos o início da perda do equilíbrio, esse comportamento é resultante do comprometimento da integridade neuronal devidos às altas temperaturas (HODSON *et al.* 1981), como na temperatura TCS, os peixes além de apresentaram perda de equilíbrio, natação com espasmos e decúbito lateral, apresentaram mudança na coloração do tegumento. A mudança da coloração se dá pela maior produção dos melanóforos, que agem de forma fisiológica, através do estímulo do sistema nervoso simpático (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Além da mudança de coloração, outras alterações externas que parecem ser uma tentativa de proteção do animal, como o aumento de secreção mucosa da pele foram observados. O aumento de células mucosas nas brânquias de alguns peixes se caracteriza como um sinal de defesa, já que o muco contém lisossomos que evitam possíveis infecções (Rinaldi *et al.*, 2005). Essas células de muco, que podem ser encontradas também no tegumento dos peixes, contêm um feromônio de alarme que é liberado na água circundante somente quando

as células estão lesadas, o que frequentemente acontece com uma simples lesão na epiderme, que pode ser ocasionada pelo aumento da temperatura ambiental (ELLIOTT, 2011a).

Todas essas alterações se referem a taxa metabólica, a quantidade de energia necessária para a manutenção das funções vitais de um organismo, num determinado tempo. Isso indica que a taxa de reações químicas e biológicas dobra quando há um aumento de 10°C na temperatura, faz com que os organismos utilizam duas vezes mais oxigênio dissolvido a cada elevação de 10°C (Oliveira, 2003). Esses comportamentos e a mudança de coloração foram observados em um estudo sobre os efeitos da temperatura feito por Cocking (1959), ele propôs três fases comportamentais em diferentes momentos (Tabela 5). As fases comportamentais sugeridas por Cocking foram evidenciadas neste trabalho.

A primeira fase foi observada no experimento nas temperaturas iniciais de 24°C a 28°C, os peixes se deslocam para as camadas superiores à procura de uma região melhor oxigenada. Esse comportamento de agitação destacou o estresse inicial, nessas situações é normal eles procurarem um local onde tenha condições mais adequadas para sua estabilidade fisiológica. A concentração de oxigênio no meio é uma variável fundamental para os organismos aquáticos, pois está diretamente ligada à obtenção da energia necessária aos processos biológicos essenciais (OLIVEIRA, 2003), uma vez que os baixos níveis de oxigênio dissolvido na água (hipóxia) é provocado pelo aumento da temperatura (ROSSO *et al.*, 2006).

A fase II e III foi observada nas demais temperaturas de 32°C e TCS, o decúbito lateral seguido de espasmos involuntários demonstra a perda do controle das atividades cerebrais (JUNQUEIRA, 2000). Também foi observada a natação lenta e perda do equilíbrio. Quando algum estressor altera a capacidade natatória dos peixes e ao mesmo tempo aumenta suas necessidades energéticas, ele diminui suas atividades biológicas devido a maior necessidade de oxigênio. Nesse caso, as atividades diminuem em decorrência da incapacidade de ventilação e do sistema circulatório obter e distribuir oxigênio. Esse estado fisiológico pode ser reversível, até um limite de tempo-intensidade da atuação do fator estressante, o comprometimento das funções vitais pode ser irreversível, culminando com a morte do animal (BREAU *et al.*, 2011; MURUGAIAN *et al.*, 2008).

Na condição hipóxica, a diminuição na taxa de consumo do oxigênio pode ser uma resposta fisiológica vantajosa, pois atenua a relação demanda/oferta do oxigênio nos tecidos, sendo uma característica comum à diversas espécies de peixes (BENNETT, 1978).

## Histologia

A epiderme do *A. brevirhinus* e de outros vertebrados, a unidade estrutural básica da epiderme dos peixes é a célula epitelial. As células epiteliais são mitoticamente ativas em todas as camadas epidérmicas, são pequenas em relação aos demais tipos de células da epiderme, podendo variar na forma dependendo da sua localização (HENRIKSON & MATOLTSY, 1968b).

O tegumento que cobre a superfície externa do corpo de um peixe é um órgão multifuncional, com características morfológicas altamente adaptadas para realizar várias funções como na proteção, comunicação, percepção sensorial, locomoção, respiração, excreção e regulação térmica (STORER, 2007).

Esse tecido consiste de duas camadas. A camada externa, epiderme, é essencialmente de estrutura celular composta por um epitélio de múltiplas camadas de células especializadas. A camada interna, a derme, é primariamente uma estrutura fibrosa com relativamente poucas células, embora possa conter escamas, nervos, vasos sanguíneos, tecido adiposo e células de pigmento (ELLIOTT, 2011b).

De acordo com ELLIOTT (2011b) as células epiteliais superficiais produzem secreções mucosas, as quais auxiliam na proteção do peixe contra agentes patogênicos e outras agressões. Essa secreção mucosa forma uma cutícula na superfície da pele, composta por secreções oriundas de vários tipos celulares distintos, a qual é continuamente renovada e descartada. As células epidérmicas são menores quando comparadas às células de muco e as células de alarme, contudo, são mais numerosas, e são encontradas desde camadas mais basais até as camadas mais superficiais do epitélio (GUERRA et al., 2006).

As células de caliciformes ou de muco são glândulas pluricelulares exócrinas, nos peixes existem dois tipos dessas células, as mucosas e as serosas, sendo mais comum as células mucosas (WHITEAR, 1986). As secreções mucosas contêm glicoproteínas, que geralmente apresentam coloração fracamente basofílica ou permanecem sem coloração em cortes histológicos, ao passo que as serosas contêm proteínas básicas e, conseqüentemente, apresentam coloração acidofílica (BLACKSTOCK & PICKERING, 1980). Na espécie estudada pode-se observar as células com secreção mucosa devido a sua não coloração citoplasmática. O número e tamanho destas células podem variar entre as espécies e dentro de uma mesma espécie em função do ambiente e estão presentes na superfície corporal de quase todos os peixes (HINTON & LAURÉN, 1990).

Uma variedade de funções tem sido atribuída às secreções das células de muco, incluindo lubrificantes que reduzem a fricção e danos mecânicos, funções de proteção contra



micro-organismos e regulatórias, como na osmorregulação, e trocas gasosas branquiais. Além da substituição contínua das secreções de muco que pode impedir a colonização por microrganismos patogênicos na superfície do corpo (ELLIOTT, 2000).

As células claviformes ou de alarme, são distintas morfologicamente das células de muco. Elas são glândulas grandes e unicelulares, possuem formato de clava ovalada sendo mono ou binucleadas. Esta célula é secretora de um feromônio (substância de alarme) que é responsável por despertar uma reação de fuga dos peixes (RALPHS & BENJAMIN, 1992). Elas são encontradas em diferentes grupos de peixes, presentes também no lambari do Jequitinhonha, contudo, sua função não está totalmente estabelecida, considera-se que estas células sejam multifuncionais (ZACCONE *et al.*, 2001).

Nos Ostariophysi, estas células produzem esse feromônio quando a epiderme é danificada, lesionando estas células e alertando os demais peixes do cardume (DUBOC, 2007). De acordo com SUZUKI (1986) essas células secretam muco relacionado à sinalização e/ou comunicação entre os indivíduos do cardume. Em alguns peixes foram identificadas a presença de condroitina e queratina (RALPHS & BENJAMIN, 1992) indicando uma função cicatrizante que ajudaria na reparação dos tecidos danificados (IGER & ABRAHAM, 1990).

A comunicação entre os peixes pode ser facilitada por substâncias produzidas no tegumento, na espécie estudada foram encontradas células de alarme que responderam ao aquecimento, como sinalização da predação uma vez que esses peixes têm o comportamento em cardume com várias finalidades (GIACOMINI *et al.*, 2015). Os cardumes se constituem com os seguintes propósitos: reduzir a predação, aumentar a eficiência da busca de alimentos, aumentar o sucesso reprodutivo, aumentar a eficiência do nado e a proteção mútua contra fatores ambientais adversos. Eles decorrem de várias causas, podendo ser classificados como cardumes de desova, de migração, de alimentação e de inverno (PAIVA & MOTA, 1999).

O tegumento de *A. brevirohinus* apresenta coloração distinta com grande concentração de cromatóforos. Os cromatóforos maduros podem ser diferenciados em subclasses segundo a cor que reflete sobre a luz, o peixe em estudo a coloração é prateada com pigmento preto/castanho denominado melanóforo. Os melanóforos contêm eumelanina, um tipo de melanina de cor preta ou castanho fosco devido à sua significativa capacidade de absorção de luz. O pigmento está em vesículas chamadas melanossomas, as quais se distribuem por todo o citoplasma celular (ITO, 2003).

Os cromatóforos (células de pigmento), também constituintes do tegumento nos peixes, atuam essencialmente na proteção do corpo contra a radiação ultravioleta (KALETA, 2009), além de ajudar na camuflagem do animal através dos diversos padrões de pigmentação

(ELLIOTT, 2011a). A pigmentação da epiderme, além da função de proteção, pode ter um importante papel na comunicação intraespecífica, podendo contribuir para a reprodução, pois ao mudar a coloração do tegumento o peixe pode tornar-se socialmente atrativo (BURTON, 2011).

A coloração dos peixes é constituída por uma interação de cromatóforos localizados na derme. Essas células são classificadas conforme o seu pigmento: melanóforo (marrom ou preto), eritróforo (vermelho) e xantóforos (amarelo), que se distribuem em todo o corpo do peixe (BULLOCK & ROBERTS, 1974).

Outra camada do tecido tegumentar desses organismos é a derme, formada principalmente de tecido conjuntivo, um estrato compacto denso, contendo fibras colágenas, fibras elásticas e poucas células conjuntivas (GROMAN 1982). De acordo com JUNQUEIRA *et al.* (1983), em todas as espécies de peixes, o colágeno apresenta-se em duas camadas distintas: uma delgada superficial (derme frouxa) e outra espessa e profunda (compacta). A derme do *A. brevirohinus* é semelhante ao encontrado na maioria dos Characiformes (SOUZA *et al.*, 2003) estudadas, composta assim, por uma lâmina basal e uma espessa camada de tecido conjuntivo denso modelado.

Em algumas espécies particulares, podem ser encontrados órgãos acessórios na pele, como escamas, células glandulares, glândulas de veneno e órgão luminosos (HIBIYA, 1982). No *A. brevirohinus* se encontram escamas, que são do tipo ciclóide arredondadas em sua ponta com função protetora e de redução do atrito ao nadar. São escamas ósseas que permitem maior flexibilidade do corpo e crescem durante toda a vida do peixe. De acordo com BEMVENUTI (2010), as escamas ósseas são formadas por duas finas camadas translúcidas: uma camada superficial óssea calcificada (principalmente composta por fosfato e carbonato de cálcio) e uma camada profunda fibrosa (basicamente de colágeno). Essas estruturas são mantidas por citoesqueleto (UEHARA *et al.*, 1991) e alguns autores propõe que sua função seja mecânica, mantendo uma camada de muco produzido por outras células sobre a superfície do epitélio (SPERRY & WASSERSUG, 1976).

Essas escamas aumentam de tamanho com o crescimento do peixe e como consequência, em muitas espécies esse crescimento determina o aparecimento de uma série de anéis concêntricos em sua margem (circulii) (STORER *et al.*, 2007). Estes anéis são muito utilizados em estudos de determinação de idade em peixes (CHUGUNOVA, 1963; SANTOS & BARBIERI, 1993).

Supostamente não há troca desse tegumento, embora ocasionalmente escamas possam ser perdidas e substituídas (STORER, 2007). Numerosos autores também exploraram o

potencial das escamas como bio- indicadores, apontando sua propriedade de acumular metais pesados e aplicação em estudos toxicológicos (ABDULLAH *et al.*, 1976).

O muco, bem como a escama, também tem capacidade de quelar metais e outros cátions presentes na água e tamponar pHs ácidos, protegendo os animais contra a queda de pH que pode acontecer quando metais são dissolvidos na água (COELLO & KHAN, 1996). Acredita-se, porém, que a maior parte de seu papel protetor se deve ao fato de o muco atuar como carreador de uma variedade de bioativos de defesa específicos em processos de comunicação e sinalização celular (ZACCONE *et al.*, 2001).

### **Histopatologia**

Os resultados das análises histopatológicas do tecido tegumentar do lambari mostraram danos a partir das temperaturas iniciais de aquecimento. Os infiltrados inflamatórios observados podem estar associados a condições de estresse ambiental (AGIUS & ROBERTS2003). Essa inflamação atrai células que constituem a primeira linha de defesa no processo inflamatório, os leucócitos. Essas células se infiltram no tecido e o preparam para a regeneração por meio da limpeza tecidual e fagocitose de detritos celulares (BONDESEN *et al.*, 2004). Segundo ELLIOTT, (2011a), leucócitos são componentes importantes de ambos os sistemas imune inato e adaptativo de peixes, e podem aumentar significativamente em quantidade na cicatrização de lesões de pele, doenças infecciosas, ou exposição a poluentes e outros estressores.

As células de defesa foram observadas nos tecidos dos peixes submetidos a todas as temperaturas de aquecimento. São as primeiras células fagocitárias a chegarem ao sítio da lesão, os leucócitos (VASCONCELOS, 2017). A resposta imune, de natureza humoral ou celular, é compatível com a sensibilidade da temperatura, promovendo a produção de anticorpos devido às reações inflamatórias nos peixes (FINN & NIELSEN, 1971).

Além desses infiltrados inflamatórios como resposta ao estresse, observamos a presença de melanóforos no estrato superficial e migração das células epiteliais. Esses grânulos contendo melanina diminuem o estresse oxidativo, contribuindo para a neutralização das espécies reativas de oxigênio (ZUASTI *et al.*, 1989). A migração de células epiteliais, contribuem para proteger as regiões lesionadas desempenhando o papel no desenvolvimento da imunidade local no tegumento (RAKERS, *et al.*, 2010)

As alterações nos tecidos, a reação inflamatória e o desarranjo tecidual começaram a ocorrer a partir da temperatura de 28°C. As células de muco, a desorganização tecidual do estrato superficial e basal do tegumento, além da migração dos melanóforos para a epiderme,

efeitos similares observados por NESKOVIC *et al.* (1996) em *Cyprinus carpio* exposto a condições de estresse.

Diversos estudos como os realizados por BANERJEE & BHATTACHARYA (1994), BERNTSSEN *et al.* (2003) e MELA *et al.* (2007), observaram alterações consideradas graves, como edema, degeneração, necrose, entre outras, nos órgãos e tecidos analisados de outras espécies. Neste estudo, no grupo da temperatura máxima (TCS), podemos evidenciar também alterações tanto no estrato superficial como no estrato basal do tegumento dos peixes testados. O experimento de TCS apresentou sinais de necrose, podendo ter ocorrido devido a uma inflamação severa induzindo a degeneração monocitária sem resposta de reparo (KONGTORP *et al.*, 2004).

Os resultados indicam também que o lambari, quando expostos ao aumento de temperatura assim como outros teleósteos, sofrem efeitos estressores e, se permanecerem sob este estresse, podem comprometer a sobrevivência e o desempenho fisiológico dos peixes (NUSSEY *et al.*, 1995).

### **Imuno-histoquímica**

Encontrou-se baixa expressão desta proteína nos grupos submetidos às temperaturas 24°C. A expressão nessa temperatura, mesmo que reduzida, é esperada, uma vez que esta proteína se encontra presente também em condições fisiológicas normais (BYRNE *et al.*, 2005; RINALDI *et al.*, 2009). Nas temperaturas mais elevadas 28°C, 32°C e TCS a expressão foi mais intensa, demonstrando que a hipóxia é um potente indutor da expressão dessa proteína (FERRARA, 2004; HUANG *et al.*, 2006).

Para a manutenção da homeostase, os eucariotos desenvolveram diversos processos que aumentam a captação e distribuição do oxigênio (LEE *et al.*, 2004). Tais adaptações envolvem mudanças genéticas a fim de moldar o metabolismo (ZHANG *et al.*, 2009). A hipóxia é um dos mais potentes estimuladores do VEGF, essa proteína de sinalização é um potente agente angiogênico, participando diretamente desse processo através do recrutamento de células endoteliais para as áreas em hipóxia (SHARKEY E COL., 2000).

Durante hipóxia severa, a demanda da síntese dessa proteína é aumentada como mecanismos de termo estabilidade que os animais possuem para responder ao estressor ambiental, como respostas para recuperar o equilíbrio ao estresse ambiental (PÖRTNER & KNUST, 2007; GOMES, 2008).

A imuno-histoquímica sustenta três conceitos científicos interligadas entre si: imunologia, histologia e química, sendo o principal a detecção de constituintes tecidulares

(antígenos - Ag), recorrendo ao uso de anticorpos específicos (Ac). Assim que ocorre uma ligação antígeno-anticorpo (Ag-Ac), esta pode ser demonstrada através de uma reação histoquímica (MATOS et al., 2010). Esse tipo de teste de imuno-histoquímica é pouco relatado para este gênero, principalmente para o tecido tegumentar e os resultados representam dados inéditos sobre a espécie.

### **Parâmetros redox**

Neste estudo avaliamos o efeito do aumento gradual da temperatura na quantificação de biomarcadores de estado redox e ação das enzimas antioxidantes no tegumento do *Astyanax brevirostris*. Estes resultados podem evidenciar a presença de estresse oxidativo, sob situação de estresse, no qual as células são capazes de ativar respostas adaptativas através de inúmeros sistemas de defesas, entre elas as defesas antioxidantes (STONE & COLLINS, 2002; COSTA & MORADAS-FERREIRA, 2001).

O estresse pode causar distúrbios fisiológicos, bioquímicos ou morfológicos, nas alterações bioquímicas têm geração de radicais livres, tais como o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), além de seus intermediários ou subprodutos como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), coletivamente chamados de Espécies Reativas de Oxigênio - EROs (LI & KARIN, 1999).

Quando EROs são produzidas como consequência de reações de transferência de elétrons na mitocôndria, peroxissomos e citosol, ativam um sistema de defesa celular conhecidos como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BARBOSA, 2001). Os mecanismos de defesas antioxidantes em peixes ainda são desconhecidos, algumas análises comparativas têm sido feitas relacionando os níveis de atividade das enzimas antioxidantes em diversos tecidos de outros grupos de vertebrados que são associados a proteções antioxidantes que vem revelando características funcionais e qualitativas muito similares, principalmente em relação à superóxido dismutase (WILHELM FILHO *et al.*, 1993).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das espécies reativas de oxigênio, atua na remoção do radical superóxido (AVILEZ *et al.* 2008). A avaliação das concentrações da SOD em diversos organismos invertebrados marinhos relacionados simbioticamente com algas foi linearmente influenciada pelo potencial fotossintético de produção do oxigênio (SHICK & DYKENS, 1985).

Nessa espécie a ação da SOD, pode ser justificado com o aumento da concentração da enzima nas temperaturas de maior estresse térmico. O mecanismo de reação se inicia com a redução da enzima pelo superóxido, resultando na formação de oxigênio. A enzima reduzida

reage com outro íon superóxido formando como produto, o peróxido de hidrogênio, que na sequência, sofre dismutação pela catalase ou outra peroxidase, originando água e oxigênio molecular (BERG *et al.* 2004).

Desta forma, juntamente com a diminuição do metabolismo oxidativo e o aumento do nível enzimático, o organismo estaria anulando consideravelmente a utilização do oxigênio, evitando a formação acentuada das espécies ativas do oxigênio. Observações comportamentais realizadas nestes animais ao longo do experimento sugerem esta possibilidade, pois os peixes permaneciam inativos por longos períodos no fundo do tanque experimental. O aumento da ação das enzimas SOD observado nas temperaturas onde os peixes apresentaram maior estresse térmico poderia ser interpretado como a SOD aumentando sua síntese para a regulação fisiológica durante à hipóxia, como forma de preparação a uma posterior reoxigenação ou a SOD poderia estar respondendo a um aumento na formação das espécies ativas do oxigênio (ANDRÉ, 2006)

A membrana celular é a estrutura que quando interage com as EROs mais desencadeia problema significativo à célula, pois resulta na peroxidação lipídica, processo que provoca alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas, comprometendo todo o metabolismo celular (FERREIRA *et al.*, 1997). Esse dano é quantificado pela determinação do conteúdo tecidual de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

No lambari o TBARS teve respostas como biomarcador na temperatura da TCS. De acordo com WDZIECZAK (1982) nos peixes, a concentração de TBARS avaliado em diversos tecidos são consideravelmente variados. O aumento de TBARS obtido nesse ambiente pode ser devido à temperatura elevada que geram situações de hipóxia, favorecendo a produção dos intermediários reativos do oxigênio (WALLACE *et al.*, 1982).

De acordo com FERREIRA *et al.* (1997), quando a peroxidação lipídica acontece, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, como por exemplo, o malondialdeído (MDA), resultando na morte celular. O malondialdeído é um aldeído reativo (baixa estabilidade) amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo que reage ao ácido tiobarbitúrico (PILZ *et al.* 2000).

De acordo com BENZIE (1996), a habilidade plasmática de redução do ferro (FRAP) é um outro tipo de teste para mensurar o poder antioxidante baseado na reação das defesas antioxidantes recorrentes a um estresse oxidativo. Observou-se essa capacidade antioxidante não enzimática reduzida nos grupos experimentais, a atividade é baixa pode ser vantajoso para

um teste de estresse oxidativo, uma vez que retarda ou previne a oxidação do substrato (HALLIWE et al, 1990).

Assim, os marcadores de estresse oxidativo e a ação das enzimas antioxidantes podem auxiliar estudos de monitoramento ambiental, no intuito de demonstrar o estado redox celular, podendo fornecer inúmeras informações sobre a ictiofauna e servindo de ferramenta complementar em trabalhos de biomonitoramento ambiental.

## 7 CONCLUSÃO

Através desse estudo podemos concluir:

- A descrição histológica do tecido tegumentar de *Astyanax brevirohinus*, apresenta características pouco descritas, contudo comuns aos teleósteos;
- O aumento da temperatura altera o comportamento do *A. brevirohinus* em relação a natação, equilíbrio e batimento opercular, provocando colapsos fisiológicos;
- *A. brevirohinus* apresenta alterações histopatológicas como: inflamação, desmembramento tecidual e necrose no tecido tegumentar devido ao aumento da temperatura.
- O aquecimento ativa diferentemente mecanismos redox no tecido, através de taxas de diferentes lesões lipídicas e proteicas em relação a temperatura ambiental;
- A proteína VEGF é expressa durante o aquecimento, comprovando a formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, a angiogênese que é o mecanismo de termoequilíbrio celular da espécie;
- Este tipo de estudo, pode ajudar a entender as relações ecológicas da ictiofauna, auxiliando no conhecimento da tolerância térmica das espécies.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, M. I.; BANKS, J. W.; MILES, D. L.; O'GRADY, K. T. **Environmental dependence of manganese and zinc in the scales of atlantic salmon, *Salmo salar* (L) and brown trout *Salmo trutta* (L).** Freshwater Biology, vol. 6, nº 2, p. 161-166, 1976.
- ABELE, D.; PUNTARULO, S. **Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. v. 138, p. 405-415, 2004.
- AGANI, F. H.; PICHIULE, P.; CHAVEZ, J. C.; LAMANNA, J. C. **The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia.** J. Biol. Chem., v. 275, n. 46, p. 35863-35867, 2000.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. **Melano-macrophage centres and their role in fish pathology.** J. Fish Disease, v. 26, p. 499-509, 2003.
- ANDRÉ, L. B. S.; BARREIROS, E.; JORGE, M.; DA, V.I.D. **Stresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Quim. Nova, Vol. 29, No. 1, p.113-123, 2006.
- ANGILLET JR., M. J. **Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis.** Oxford, UK: Oxford University Press. p.304, 2009.
- ARRATIA, G. **The skin of catfishes-a review,** In: Arratia, G., Kapoor, B. G., Chardo, M. & Diogo, R., E. (Ed.), Catfishes. Science Publishers Inc, Enfield, NH and Plymouth, p. 177– 199, 2003.
- AVILEZ, I.M.; HORI, T.S.F.; ALMEIDA, L.C.; HACKBARTH, A.; NETO, J.C.; BASTOS, V.L.F.C.; MORAES, G. **Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae).** Comparative Biochemistry and physiology Part, p.136-142, 2008.

BALDISSEROTO, B.; CHIPPARI-GOMES, A.R; LOPES, N.P; BICUDO, J.E.P.W; PAULA-SILVA, M.N; ALMEIDA-VAL, V.M.F; VAL, A.L. **Ion fluxes and hematological parameters of two teleosts from the Rio Negro, Amazon, exposed to hypoxia.** *Braz. J. Biol.* 68(3): 571-575, 2008.

BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. **Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of Elsan, Mercury and Ammonia.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.29, p.265-275, 1994.

BARBOSA, D. S. **Efeito do tratamento com Sulfassalazina e Acido graxos a-3 de óleo de peixe sobre o estresse oxidativo na retocolite ulcerativa inespecífica.** Tese Doutorado, UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu (SP), 2001.

BARTON, B. A. **Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids.** *Integrative and Comparative Biology*, v.42 n.3, p.517-525, 2002.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.** *Annual Review of Fish Diseases*, v.1, p. 3-26, 1991.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. **DNA damage responses to oxidative stress.** *DNA Repair*, v. 3, p.1109–1115, 2004.

BASU, N.; TODGHAM, A. E.; ACKERMAN, P. A.; BIBEAU, M. R.; NAKANO, K.; SCHULTE, P. M.; IWAMA, K. **Heat shock protein genes and their functional significance in fish.** *Gene*, v.295, p.173-183, 2002.

BEITINGER, T. L.; BENNETT, W. A.; MCCAULEY, R. W. **Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature.** *Environmental biology of fishes*, v. 58, n. 3, p. 237-275, 2000.

BEMVENUTI, M. A; FISCHER, L. G. **Peixes: morfologia e adaptações,** *Cadernos de Ecologia Aquática* 5 (2): 31-54, 2010.

BENNETT, A. F. **Activity metabolism of the lower vertebrates**. Ann. Rev. Physiol., v.400, p. 447-469, 1978.

BEREITERHAHN, J.; MATOLTSY, A.G. & RICHARDS, K.S. (ed.) **Biology of the Integument**. Vol. 2, Vertebrates, Springer Verlag, New York. p. 9–64, 1986.

BENNETT, W. A.; JUDD, F. W. **Comparison of methods for determining low temperature tolerance - experiments with pinfish, *Lagodon rhomboides***. Copeia, v. 4, p.1059-1065, 1992.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. **The ferric reducing ability of plasma, (Frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay**. Anal Biochem. p. 239:70-6, 1996.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BERNTSSEN, M.H.G. et al. **Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr.** Aquatic Toxicology, v.65, n.1, p.55-72, 2003.

BILYK, K.T.; DEVRIES, A. L. **Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. Comparative biochemistry and physiology**. Part A, Molecular & integrative physiology, v.158, n.4, p.382-90, 2011.

BLACKSTOCK, N., PICKERING, A D. **Células granulares acidófilas na epiderme da truta marrom, *Salmo trutta* L.** Cell Tissue Res. 210, p.359-369, 1980.

BONDESEN, B. A. et al. **The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration**. American Journal of Physiology. Cell Physiology, v. 287, n. 2, p. C475-483, 2004.

BOWLER, C. et al. **Superoxide dismutase and Stress tolerance**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v.43, p.83-11, 1992.

BREAU, C.; CUNJAK, R. A.; PEAKE, S. J. **Behaviour during elevated water temperatures: Can physiology explain movement of juvenile Atlantic salmon to cool water?** J. Anim. Ecol., v. 80, p. 844–853, 2011.

BRETT, J. R. Environmental Factors and Growth. In: Hoar.W. S. et al. (Ed.) Fish Physiology. 1° ed. Academic Press, San Diego, v. 8, pp.559-675, 1979.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K .Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação 2ª edição revista e ampliada.** Brasília, EMBRAPA, 2ª Ed., v. 1, 2007.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco).** 3 ed. Brasília: Câmara dos Deputados/CODEVASF, p.143, 1988.

BOUDREAU, N., MYERS, C. **Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment.** Breast Câncer Research, 5, 140-6, 2003.

BULLOCK, A.M.; ROBERTS, R.J. **The dermatology of marine teleost fish I, The normal integument.** *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* v.13, p.383-411, 1974.

BURTON, D. **The skin | Coloration and chromatophores in fishes, encyclopedia of fish physiology.** Elsevier, 2011.

BUSTAMANTE, M.M.C. **Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems.** *Braz. J. Biol.*, vol.72, n.3, p.655-671, 2012.

BYRNE, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J. H. 2005. **Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).** J. Cell. Mol. Med., v. 9 (4), p. 777-794.

CHANG, W.J., HWANG, P.P., **Desenvolvimento de epiderme de peixe zebra. Defectos de nascimento Res.** Parte C - Embryo Today Rev. 93, p.205-214, 2011.

CHUGUNOVA, N. I. **Estudos de idade e crescimento em peixes**. National Science Foundation, 132 p. 1963.

COCKING, A.W. **The effect of high temperatures on roach (*Rutilus rutilus*). II: The effect of temperature increasing at a known constant rate**. J. Exp. Biol. 36, 217–226; 1959.

COELLO, W. F.; KHAN, A. Q. **Protection against heavy metal toxicity by mucus and scales in fish**. Archives of environmental contamination and toxicology, vol. 30, p. 319-326, 1996.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL. Instituto Estadual de Florestas – MG. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da mata atlântica e campos sulinos**. Brasília: MMA/SBF, p. 40, 2000.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. **Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases**. Mol Aspects Med, v.22, n. 4-5, p.217- 246, 2001.

CRAIG, E. A. **The heat shock response**. CRC Crit. Rev. Biochem., v. 18, p. 239-280, 1985.

COCKING, A.W. **The effect of high temperatures on roach (*Rutilus rutilus*). II: The effect of temperature increasing at a known constant rate**. J. Exp. Biol. 36, 217–226; 1959.

DAS, T.; PAL, A. K.; CHAKRABORTY, S. K.; MANUSH, S. M.; SAHU, N. P.; MUKHERJEE, S.C. **Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures**. Journal of Thermal Biology v.30, p.378–383, 2005.

DAVIES, R.; MOYES, C. D.; WANG, Y. **Intra- and Inter-specific variation in metabolic gene expression in relationship to environmental hypoxia**. Comp. Biochem. Physiol., Part A, v. 159, p. 25–31, 2011.

DE LAS HERAS, V.; MARTOS-SITCHA, J. A.; YÚFERA, M.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. **Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) juveniles.** *Aquaculture*, 448, 29-37, 2015.

DUBOC, L.F. **Análise comparativa e ecológica da reação de alarme em duas espécies de *Mimagoniates* (Ostariophysi, Characidae, Glandulocaudinae).** *Rev. Bras. Zool.* 24, p.1163-1185, 2007.

ELLIOTT, D.G. **The integumentary system. Microscopic functional anatomy,** In: Ostrander, G. (Ed.), *The Laboratory Fish*. Academic Press, p. 271-306, 2000.

ELLIOTT, D.G. **The skin | Functional morphology of the integumentary system in fish,** *Encyclopedia of Fish Physiology*. Elsevier Inc., p.476-488, 2011b.

ELLIOTT, D.G. **The skin | Many functions of fish integument,** *Encyclopedia of Fish Physiology*. Elsevier Inc., p.476-488, 2011a.

ENZOR, L. A. **Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors.** *J. Exp. Biol.* 217, 3301-3310. doi:10.1242/jeb.108431, 2014.

ESTEVEZ, F. de A. **Fundamentos de Limnologia.** 2ª Ed. Rio de Janeiro. Interciência. p. 226, 1998.

FERRARA, N. **Vascular Endothelial Growth Factor: basic science and clinical progress.** *Endocrine Reviews*, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004b.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERREIRA, M. J.; MACEDO, A. N. D. V. **The method of oxidative stress threshold detection applied in professional soccer players.** Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2011.

FINK, S.V., FINK, W.L. **Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei).** Zool. J. Linn. Soc. Lond., p.297-353, 1981.

FINN, J.P.; NIELSEN, O. N. **The effect of temperature variation on the inflammatory response of rainbow trout.** J. Path. P.257-268, 1971.

FIORUCCI, R. A.; FILHO, E. B. **A importancia de oxigenio dissolvido em ecossistemas aquáticos.** Química nova escola, n.22, 2005.

FREDERICH, M.; PORTNER, H. O. **Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab *Maja squinado*.** Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol, v. 279, p. 1531-1538, 2000.

FRY, F. E. J. **Effects of the environment on animal activity.** Publ. Ontario Fish. Res. Lab., v. 68, p. 1-62, 1947.

GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. **Bem estar animal: um conceito legítimo para peixes?** Revista de etologia, v.8, n.1, p.51-61,2006.

GARAVELLO, C.G. **Estudo da ictiofauna dos rios Jequitinhonha e Araçuaí, Estado de Minas Gerais.** Revisão de grupos taxonômicos e considerações sobre uma distribuição das espécies, 2017.

GARG, T. K. DOMINGOS, F. X. V; ALMEIDA, V. A. L.; V. M. F.; VAL, A. L. **Histoquímica e organização funcional da pele dorsal de *Ancistrus dolichopterus* (Siluriformes: Loricariidae).** Neotrop. Ichthyol, 2010.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. **Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do**

**gênero na bacia.** Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Sér. Zool. Porto Alegre, v.13, p.65-88, 2000.

GIACOMINI, A. C. V. V. et al. **My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish.** Physiology & Behavior. v. 139, p. 182-187, 2015.

GÉRY, J. Characoids of the world. T.F.H., Neptune City. 672p. 1977.

GOMES, V. **Estudo ecofisiológico de anfípodas da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.** Tese de livre-docência. Universidade de São Paulo, Departamento de Oceanografia Biológica, 2008.

GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L.; VONO, V. Peixes da bacia do rio Jequitinhonha. In: LOWEMCCONNEL R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: EDUSP, p. 414-423; 1999.

GRAÇA B, LUNET C, COELHO AS, MONTEIRO G, FREIRE P, SPEIDEL A, CARVALHO L. **Angiogênese e cancro, da fisiopatologia à terapêutica.** Acta Med Port, v.17, p.76-93, 2004.

GROMAN, D. **Histology of the Striped bass.** Connecticut: Starrs, p.116, 1982.

GUERRA, R.R.; SANTOS, N.P.; CECARELLI, P.; MANGETTI, A. J.; SILVA, J.R.M.C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J. **Stratum adiposum, uma estrutura especial da pele de peixe-gato africano (Clarias gariepinus, Burchell 1822).** J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol. 35, p.144-146, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 3. ed. New York: Oxford University Press, p. 936, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** Oxford: Clarendon Press, p. 543, 1990.



HENRIKSON, R.C.;MATOLTSY, A.G. **A estrutura fina da epiderme teleostática. II. Células mucosas.** J. Ultrastruct. Res. 221, p. 213-221. 1968b.

HEGERL, G.C.; ZWIERS, F.W.; BRACONNOT, P.; GILLET, N.P.; LUO, Y.; MARENGO, J.A.; NICHOLLS, N.; PENNER, J.E.; STOTT, P.A. Understanding and Attributing Climate Change. In: SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K.B.; TIGNOR, M.; MILLER, H.L. (Orgs.) **Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.** Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA; 2007.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features.** Tokio: Kodansha, p.147, 1982.

HINTON, D. E. LAURÉN, D. J. **Abordagens histopatológicas integrativas para detectar efeitos de estressores ambientais em peixes.** American Fisheries Society Symposium, n. 8, p. 51-66, 1990.

HODSON, R.G.; FECHLEM, R.J.; MONROE, R.J. **Upper temperature tolerance of three species of marine fishes.** J. Mar. Res, v. 24, p. 131–140; 1981.

HOFMANN, G. E.; TODGHAM, A. E. **Living in the now: Physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment.** Annu. Rev. Physiol. v.72, p. 127-145, 2010.

**IGAM - INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS:** Disponível em:  
<http://www.igam.mg.gov.br/component/content/160?task=view> - Portal do Meio Ambiente.  
 Acesso em: 23/07/2018.

ICMBio. **Plano de Manejo do Parque Nacional da Sempre-Vivas,** 2016.

IGER, Y.; ABRAHAM, M. **O processo de cura da pele em carpa ferida experimentalmente.** J. Fish. Biol., 36: 421-437, 1990.

IPCC. Climate Change: Synthesis Report. **A Contribution of Working Groups I, II, and III to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**[Watson, R.T. and the Core Writing Team (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, and New York,NY, USA, p.398, 2001.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate Change 2007: **The Physical Science Basis. Summary for Policymakers. Contribution of the Working Group I to the Fourth Assessment Report.** World Meteorological Organization. Geneva. p.21, 2007.

ITO, S; WAKAMATSU, K. **Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review.** *Pigment Cell Res.* **16**, p. 523–31, 2003.

JUNK, W.J. **The Central Amazon Floodplain: Ecology of a Pulsing System.** Springer Verlag Berlin Heidelberg. p. 536, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.524, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JOAZEIRO, P.P.; MONTES, G.S. **É possível o aproveitamento industrial da pele dos peixes de couro?** *Tecnicouro*, v.5, n.5, p.4-6, 1983.

KALETA, K. **Morphological analysis of chromatophores in the skin of trout.** *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 53, p.117–121, 2009.

KONGTORP, R. T.; TAKSDAL, T.; LINGOY, A., **Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*** - Diseases of Aquatic Organisms, 2004

KUBITZA, F. **Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões.** Ed. F. Kubitza: Jundiaí. p.229, 2003.

LE GUELLEC, D.; MORVAN-DUBOIS, G.; SIRE, J.Y. **Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*).** Int. J. Dev. Biol. 48, p. 217–231, 2004.

LEE, J.; BAE, S.; JEONG, J.; KIM, S.; KIM, K. **Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions.** Exp. Mol. Med., v. 36 (1), p. 1-12, 2004.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSEROTTO, B.; MORAES, G. & MORSCH, V. M. **Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameter of *Rhamdia quelen*.** Aquaculture, v.239, p. 497-507, 2004.

LI, N.; KARIN, M. **Is NF- $\kappa$ B the sensor of oxidative stress?** Faseb J. p.1137-43, 1999.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA L. R.; BUCKUP P. A.; SILVA J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H.F.

**Genera Incertae Sedis in 56 Characidae. In: Reis RR, Kullander SO e Ferraris Jr.(Eds.).**

Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, p. 106-113 2003.

LINS, J. A.P. KIRSCHNIK, P. G, QUEIROZ, V. S, CIRIO,S. M. **Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment.** Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient. Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LOOMIS, T.A.; HAYES, AW. **Loomis's essentials of toxicology**, London, Academic press, 48 Ed, p. 48, 1996.

MARIANO, W. S. **Respostas Fisiológicas e Bioquímicas do jeju, *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) a exposição aérea.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, p.72, 2006.

MARTINEZ-ÁLVAREZ, R.M.; HIDALGO, M.C.; DOMEZAIN, A.; MORALES, A.E.; GARCIA- GALLEGO, M.; SANZ, A. **Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity**. J. Exp. Biol, 205: 3699- 3706, 2002.

MATOS, L.L.; TRUFELLI, D.C.; MATOS, M.G.L.; PINHAL, M.A.S. **Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice**. Biomarker Insights, p.9-20, 2010.

MAXWELL, S.R.J. **Prospects for the use antioxidant therapies**. p. 345-361, 1995.

MELA, M. et al. **Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus***. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.68, p.1, 2007.

METZGER, R.; SARTORIS, F. J.; LANGENBUCH, M.; PORTNER, H. O. **Influence of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer pagurus***. J. Therm. Biol. 32: 144–151, 2007.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). **Áreas prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira**. MMA, Brasília, Brasil, 2003.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. **Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus***. Chemosphere. p. 294-299, 2010.

MONTEIRO, F, T. **Os (as) apanhadores (as) de flores e o Parque Nacional das Sempre-Vivas (MG): travessias e contradições ambientais**. Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de mestrado, 2011.

MOREIRA, C.R. **Relações filogenéticas na Ordem Characiformes** (Teleostei: Ostariophysi). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, p.485, 2007.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. **Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of whitebut not red-blooded Antarctic notothenioid fishes.** Journal of Experimental Biology. v. 215, n. 20, p. 3655-3664, 2012.

MURUNGAIN. P, RAMAMURTHY, V. KARMERGAM. N. **Efect of temperature oh muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon Salmo sala** - Diseases of Aquatic Organisms, 2004.

NELSON, J.S., **Fishes of the world.** 4 ed. John Wiley, New Jersey. 622p. , 2006.

NEŠKOVIC, N.K.; POLEKSIC<sup>1</sup> V.; ELEZOVIC<sup>2</sup> I. et al. **Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, Cyprinus carpio L.** Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.56, p.295-302, 1996.

NETO, J; M; F;A E DONADON, C;C;. **Cinética de marcadores de estresse oxidativo para a avaliação de ‘overreaching’ induzido pelo exercicio físico exaustivo.** EFDeportes.com, Revista Digital. Buenos Aires, Año 16, Nº 162, 2011.

NICOSIA, R. **What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis?** Am J Pathol, v.153, p.11-16, 1998.

NIKINMAA, M.; REES, B. B. **Oxygen-dependent gene expression in fishes.** Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 288, p. 1079–1090, 2005.

NUSSEY, G. et al. **Effects of copper on the differential white cell counts of the Mozambique tilapia, Oreochromis mossambicus.** Comp. Biochem. Physiol., Oak Brook, v. 111, n. 3, p. 381-388, 1995.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L.RB. **Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável.** In: TAVARES-OIAS, M. (Org.) Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Embrapa Amapá, Macapá, p.226-247, 2009.

OLIVEIRA, C. et al. **Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling.** BMC Evolutionary Biology, v.11, n.1, p.275, 2011.

OLIVEIRA, R. D. **Efeitos da temperatura nas respostas cardio-respiratórias e na respiração aérea acessória de jeju, *Hoplerthrinus unitaeniatus* (Erythrinidae) aclimatação a 15, 20, 25 e 30°C e submetidos a variações de O<sub>2</sub> ambiental.** [Tese de Doutorado]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2003.

PACHECO, R.B. **Estudos citogenéticos em diferentes populações de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Tetragonopterinae).** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina. p. 97, 2001.

PAIVA, M.P. **Capturas da sardinha-verdadeira, *Sardillella brasiliensis* (Steindachner) (Osteichthyes: Clupeidae) e da fauna acompanhante. no estado do Rio de Janeiro (Brasil) - (1993-1997).** Arq. Ciên. Mal', Fortaleza, p.85-88, 1999.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUNDDIN, S. **Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.).** The Science of the Total Environment. v. 309, 9. p.105 –115, 2003.

PANFILI, J. ; DE PONTUAL, H. ; TROADEC, H. ; WRIGHT, P. J. **Manual de esclerocronologia de peixe.** Brest, França. Ifremer-IRD coedition, p.464 , 2002.

PARMESAN, C. **Ecological and evolutionary responses to recent climate change.** Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 37, 637–669, 2006.

PILZ, Jurgen, MEINEKE, Ingolf, GLEITER, Christoph H. **Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative.** Journal of Chromatography B, 742 p.315–325, 2000.

PÖRTNER, H. O. **Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals.** Comp. Biochem. Physiol. Part A v. 132, p. 739-761, 2002.

PÖRTNER H. O.; BOCK C.; LANNIG, O.; MAGNUS, L.; MARK, F.C.; SARTORIS , F.J .  
**Cod and climate in a latitudinal cline: physiological analyses of climate effects in marine fishes.** Clim. Res. 37:253-270, 2008.

PÖRTNER H. O. LANNIG G. **Oxygen And Capacity Limited Thermal Tolerance.** In Jeffrey G. Richards, Anthony P. Farrell, and Colin J. Brauner, editors: Fish Physiology, Burlington: Academic Press, p.143-191, 2009.

PÖRTNER, H. **Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals.** Naturwissenschaften, v. 88, n. 4, p. 137-146, 2001.

PÖRTNER, H. O. **Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals.** Comp. Biochem. Physiol. Part A v. 132, p. 739-761, 2002.

PÖRTNER, H.; KNUST, R. **Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance.** Science, v. 315 (95), p. 95-97, 2007.

PÖRTNER, H.O., MARK, F.C., BOCK, C., **Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques.** Respir. Physiol. Neurobiol. v.141, p.243-260, 2004.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. **Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production.** Physiological Reviews, Baltimore, v. 88, p. 1243-1276, 2008.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. **Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay.** Journal Agriculture and Food Chemistry, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

PUNZO, F.; ROSEN, L. **Comparative temperature and water relations of *Tenebrio obscurus* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae).**Comp. Biochem. Physiol. A, v.77,

p.779-784, 1984.

RAKERS, S., GEBERT, M., UPPALAPATI, S., MEYER, W., MADERSON, P., SELL, A.F., KRUSE, C., PAUS, R. **“Fish matters”: The relevance of fish skin biology to investigative dermatology.** Exp. Dermatol. p.313–324, 2010.

RALPHS, J.R .; BENJAMIN, M. **Chondroitin e keratansulfato nas células do clube epidérmico de teleósteos.** JournalofFishBiology, v.40, p.473-475, 1992.

REYES, I.; DÍAZ, F.; RE, A. D.; PÉREZ, J. **Behavioral the rmoregulation, temperaturetolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures.** J. Ther. Biol., v. 36, p. 200–205, 2011.

RINALDI, L.; BASSO, P.; TETTAMANTI, G.; GRIMALDI, A.; TEROVA, G.; SAROGLIA, M.; EGUILEOR, M. **Oxygen availability causes morphological changes and a different VEGF/Fik-1/HIF-2 expression pattern in sea bass gills.** Ital. J. Zool., v. 72 (2), p. 103-111, 2005.

ROSSO, F. L.; BOLNER, K. C. S.; BALDISSEROTTO, B. **Ion fluxes in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels.** Neotropical Ichthyology, p.435-440, 2006.

SANTOS, G. B .; BARBIERI, G. **Idade e crescimento do "Piau Gordura", *Leporinus piau* Fowler, 1941, na represa de Três Marias (Pisces, Ostariophysi, Anostomidae).** Revista Brasileira de Biologia, vol. 54, n.4, p. 649-658, 1993.

SARTÓRIO, P. V. **Expressão histoimunológica de proteínas relacionadas à hipóxia tecidual em juvenis de *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae) em função do aquecimento gradual de temperatura.** 2013. 136f. Tese Mestrado- Instituto Oceanógrafo da Universidade de são Paulo. São Paulo. 2013.

SCHMIDT-NIELSEN K. **Energy metabolismo.**Animal Physiology: Adaptation and environment. 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, p.607, 1997.



SHARKEY, A. M., DAY, K., MCPHERSON, A., MALIK, S., LICENCE, D., SMITH, S. K., CHARNOCK-JONES, D. S. **Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia.** The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85, p.402-409, 2000.

SHICK, J.M.; DYKENS, J. A. **Oxygen detoxification in algal-invertebrate symbioses from the great barrier reef.** Oecologia, p.33-41, 1985.

SIES H; JONES, D.P. **Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. Oxidative Stress: Introductory remarks.** v.1. London: Academic Press,. p. 1-8. 9, 1985. Chem Biol Interact 163(1-2): 38-53, 2006.

SIES, H. **Strategies of antioxidant defence.** Review. European Journal of Biochemistry, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SILVA, F. C., RIBEIRO, R. C , CHAVES, A. C. L. **Radicais livres e antioxidantes: concepções e expectativas dos professores do ensino médio** free radicals and antioxidants: conceptions and expectations of high school teachers , 2009.

SILVA, J. M. C.; OREN, D. C. **Application of parsimony analysis of endemism (PAE) in Amazon biogeography: an example with primates.** Biological Journal of the Linnean Society. 59:427–437, 1996.

SIRE, J. Y .; AKIMENKO, M. A. **Desenvolvimento de escala em peixes: uma revisão, descrição de Woth da expressão de hedgehog sonic (shh) no peixe-zebra (Danio rerio).** International Journal of Developmental Biology, vol. 48, p. 233-247, 2004.

SOUZA, L.; CAETANO, L. G.; DIAS, A. L. **Karyotypic study of three species of Pimelodus (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguai River Basin.** Cytologia ,p.345-350, 2003.

SPERRY, D. G.; WASSERSUG, R. J. **A proposed function for microridges on epithelial cells.** The Anatomical Record, vol. 185, p. 253-258, 1976.

STONE, J. R.; COLLINS, T. **The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses.** Endothelium, v.9, n.4, p.231-238. 2002.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. (1979). **Zoologia Geral.** 6ª Edição. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p.816, 2007.

SUZUKI, Y.; KANEKO, T. **Demonstration of the mucous hemagglutinin in the club cells of eel skin.** Dev. Comp. Immunol. p. 509-518, 1986.

TKACHENKO, H.; KURHALUK, N.; GRUDNIEWSKA, J.; ANDRIICHUK, A. **Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis.** Fish physiology and biochemistry, p.1289-1300, 2014.

UEHARA, K.; MIYOSHI, M.; MIYOSHI, S. **Cytoskeleton in microridges of the oral mucosal epithelium in the carp, *Cyprinus carpio*.** The Anatomical Record, vol. 230, p. 164-168, 1991.

VASCONCELOS, A.B.S. **Efeito fotobiomodulador da terapia com diodo emissor de luz de baixa intensidade na inflamação muscular induzida por exercício em ratos .** Dissertação de mestrado. ri.ufs.br,2017.

VIEIRA, F. ALVES, C.B.M.; POMPEU, P. S. Diagnóstico de vertebrados: peixes. Em: DRUMMOND, G. M. ; MARTINS, C. S. ; GRECO, M. B. & VIEIRA, F. (Org.). **Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre uma biodiversidade não estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p. 181-219, 2009.

WALLACE, W.J.; HOUTCHENS, R.A.; MAXWELL, J.C. AND CAUGHEY, W.S. **Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins.** J. Biol. Chem, p. 4966-4977, 1982.

WHITEAR, M.; BEREITERHAHN, J.; MATOLTSY, A.G.; RICHARDS, K.S. **The skin of fishes including cyclostomes: Epidermis.** In: (ed.) Biology of the Integument. Vol. 2, Vertebrates, Springer Verlag, New York. p. 9–64, 1986.

WILHELM FILHO, D.; GIULIVI, C. AND BOVERIS, A. **Antioxidant defences in marine fish. I - Teleosts.** Comp. Biochem. Physiol.p. 409-413, 1993.

WILLMER P., GRAHAM S. & JOHNSTON I. **Enviromental physiology of animals** – 2nd edition Blackwell Publishing. Pages 179-215, 2005.

WURTS, W.A.; DURBOROW, R.M. **Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds.** Aquaculture program. SRAC-public, n .464, p. 1-4, 1992.

WDZIECZAK, J.; ZALÉSNA, G.; WUJEC, E. AND PÉRÈS, G. **Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species.** Comp. Biochem. Physiol. 73B: 361-365; 1982.

YAGI, K. A. **A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma.** *Biochemistry and Medicine*, v. 15, p. 212-216, 1976.

YAMASHITA, M.; YABU, T.; OJIMA, N. **Stress protein Hsp70 in fish.** *AquaBioScience Monographs*. v. 3, n. 4, p. 111-141, 2010.

ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G.; FASULO, S.; AINIS, L. **Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes.** *Advances in marine biology*, vol. 40, p. 255-348, 2001.

ZHANG, Y.; SHAO, Z.; ZHAI, Z.; SHEN, C.; POWELL-COFFMAN, J. A. **The HIF-1 HypoxiaInducible Factor modulates lifespan in C. elegans.** *PlosOne*, v. 4.; p. 1-9, 2009.

ZUASTI, A.; JARA, J. R.; FERRER, C.; SOLANO, F. **Occurrence of melanina granules and melanogenesis in the Kidney of Sparus auratus.** *Pigment Cell Research*, v.2, p.93-99, 1989.

**ANEXO I****Protocolo de desidratação, diafanização e inclusão dos tecidos****Desidratação:**

Álcool 50°	over night
Álcool 60°	1h
Álcool 70°	1h
Álcool 80°	1h
Álcool 90°	1h
Álcool 100°(I)	1h
Álcool 100°(II)	1h

**Diafanização:**

Xilol I	1h
Xilol III	2h

**Inclusão:**

Parafinahistológica I	overnight
Parafinahistológica II	1h
Parafinahistológica III	emblocagem

**\*A troca entre a parafina I e II ocorre dentro da estufa.**

## ANEXO II

### Protocolo de coloração – Hematoxila/ Eosina

- Lâminas por 2h horas na estufa a 60°

- Filtrar hematoxilina e eosina

Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
H <sub>2</sub> O torneira	3 minutos
Hematoxilina	20 segundos
H <sub>2</sub> O corrente	10 minutos
H <sub>2</sub> O destilada	3 banhos
Eosina	55 segundos
Álcool 95	Super rápido
Álcool 100 I	2 trocas
Álcool 100 II	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol montagem	colagem das lamínulas

\*Colagem das lamínulas com permount

\*Deixar secar overnight

## ANEXO III

### Protocolo da sinalização das lâminas

#### Oganosilano - 3' Aminopropyl - Triethoxysilane

Preparação das lâminas com organosilano (estocar a 2 - 8°C) (Usar luvas)

- Lavar as lâminas com detergente a 10% ( Extran MA 02 Neutro - Merck ) diluído em água destilada - 10 a 20 min
  - Lavar em água corrente por 30 minutos
  - Lavar em álcool a 95%
  - Secar as lâminas uma a uma com pano limpo
  - Colocar na solução com silano
- 1º cuba - organosilano a 4% (para muitas lâminas) ou 2% (para poucas lâminas) em acetona pura PA - 1 minuto
- Retirar o excesso
- 2º cuba acetona pura 4 mergulhadas - escorrer e colocar em água corrente 1 minuto
- 3º cuba - lavar em água destilada rapidamente
- Secar em temperatura ambiente (de preferência) ou em estufa a 37°C por 3h.

**ANEXO IV****Protocolo da Imuno-Histoquímica**

Estufa 37°C	Overnight
Xilol I	15 minutos
Xilol II	15 minutos
Álcool 100% I	5 minutos
Álcool 100% II	5 minutos
Álcool 95%	5 minutos
Álcool 70%	5 minutos
H <sub>2</sub> O destilada	5 minutos
Tampão citrato – temperatura ambiente	5 minutos
Tampão citrato – temperatura 95° C	30 minutos
Tampão citrato – temperatura ambiente	20 minutos
H <sub>2</sub> O destilada – (sob agitação)	2 minutos
H <sub>2</sub> O destilada –	2 minutos
Tampão PBS	5 minutos
Bloqueio Peroxidase endógena 3%	30 minutos
Tampão PBS (sob agitação) I	5 minutos
Tampão PBS II	5 minutos
Tampão PBS (sob agitação) III	5 minutos
Secagem com papel filtro, contorno com caneta histológica ao redor dos cortes	
Protein block (Super Block) Temperatura ambiente	5 minutos
Anticorpo (AC) 1° -4° a 8° C	20 horas
Secagem AC 1°	
Rinsagem em tampão PBS	
Tampão PBS (sob agitação) I	5 minutos
Tampão PBS II	5 minutos
Tampão PBS III	5 minutos
Secagem com papel filtro	
Anticorpo (AC) 2° - Temperatura ambiente	30 minutos
Tampão PBS (sob agitação) I	5 minutos
Tampão PBS II	5 minutos
Tampão PBS (sob agitação) III	5 minutos
Rinsagem H <sub>2</sub> O destilada	

DAB (Chromogen Substrate Bulk Pack, SeyTek Laboratories)	5 minutos
Rinsagem em H <sub>2</sub> O destilada	
DAB (Chromogen Substrate Bulk Pack, SeyTek Laboratories)	5 minutos
H <sub>2</sub> O destilada (sob agitação)	5 minutos
H <sub>2</sub> O destilada	5 minutos
Hematoxilina	15 segundos
Água corrente	20 minutos
Álcool 70%	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 100% I	2 minutos
Álcool 100% II	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos
Xilol III	Montagem

\*Montagem das lâminas com lamínulas fixadas com permout